

Untersuchungen über die Verwendung
von Trockenmilch und
Glykokoll in der Samenpufferung

Walter Greiff

Aus der Gynäkologischen und Ambulatorischen
Tierklinik der Universität München
Vorstand: Professor Dr. W. B a i e r

Untersuchungen über die Verwendung
von Trockenmilch und
Glykokoll in der Samenpufferung



Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der veterinärmedizinischen Doktorwürde der
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt
von
Walter G r e i f f
aus
Memmingen

München 1957

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Professor Dr. H. L i e b m a n n

Referent: Professor Dr. Walter B a i e r

Tag der Promotion: 24. Juli 1957

Dem Andenken meiner Mutter
und meinem lieben Vater
in Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

	<u>Seite:</u>
Einführung	1
Besprechung des Schrifttums	2
Material und Methodik	19
Gewinnung, Verdünnung und Beurteilung des Samens	19
Die Messung der Wasserstoffionenkonzentration	20
Die manometrische Methode zur Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs	20
Die Durchführung der Atmungsversuche	21
Beschreibung der Versuche	24
Teil A: Mikroskopische Untersuchung von Ejakulaten in verschiedenen Verdünnungsmedien	24
Verdünnungsversuche mit Trockenmilch	24
Versuche mit Trockenmilch und Gelatinezusätzen	27
Versuche mit Trockenmilch und Eidotterzusätzen	28
Versuche mit Trockenmilch und Glykokollzusätzen	29
Vergleiche von Molico-Glykokoll-Gelatine mit Eidotterspermasol bzw. Molico	32
Versuche mit Spermasol N und Glykokollzusätzen	35
Vergleich von Spermasol N mit Spermasol G	37
Vergleich von Spermasol N, Spermasol G und Molico- Glykokoll-Gelatine	39
Teil B: Atmungsversuche	41
Messung des Sauerstoffverbrauchs von Spermasol N und Spermasol G in verschiedenen Zeitabständen	42
Messung des Sauerstoffverbrauchs von Spermasol N und Sper- masol G bei verschiedenen Verdünnungsgraden	48
Diskussion der Ergebnisse	52
Zusammenfassung	61
Literaturübersicht	62
Lebenslauf	72



Digitized by the Internet Archive
in 2026

E i n f ü h r u n g

Die Pufferung des Samens spielt in der künstlichen Besamung deswegen eine sehr grosse Rolle, weil durch sie

- 1) die Lebensdauer verlängert und die Befruchtungsfähigkeit der Samenzellen erhalten wird, um die Zeitspanne zwischen Samenentnahme und Insemination ausdehnen zu können,
- 2) das Erbgut wertvoller Vartiere einer wesentlich grösseren Zahl von Muttertieren als bei der natürlichen Paarung zugänglich wird.

Bis heute haben sich als Medien vor allem Flüssigkeiten mit Zusatz von Eidotter als geeignet erwiesen. Wegen verschiedener Nachteile des Eidotters wird jedoch besonders von seiten der Praxis die Erstellung eines eidotterfreien Verdünnungsmediums angestrebt.

Unter diesem Gesichtspunkt soll in den folgenden Untersuchungen die Verwendung verschiedener Trockenmilchpulversorten überprüft werden.

Da in jüngster Zeit dem Glykokoll als Zusatzmittel eine aktivierende Wirkung auf Spermien zugesprochen wird, wurde es in die Untersuchungen mit einbezogen.

S c h r i f t t u m

Die ersten Verdünnungsversuche für Sperma wurden von dem italienischen Forscher Lazzaro S p a l l a n z a n i in den Jahren 1780 - 1785 an Hündinnen durchgeführt (zit. nach 30). Seine Verdünnungsmittel waren hauptsächlich Körperflüssigkeiten oder Körpersekrete. Er setzte bei seinen Untersuchungen der Samenflüssigkeit Galle, Blut, Harn und Wasser zu und erzielte bei Verdünnung mit Wasser gute Befruchtungserfolge, selbst dann noch, als er das Verdünnungsverhältnis auf 1:1.000 erhöht hatte.

Erst viel später kam der deutsche Tierarzt H o f f m a n n (33) auf die Verwendung von Körpersekreten zurück und empfahl frische Milch als Verdünnungsmittel. Elia I w a n o w (1889-1930) (zit. nach 30) führte erstmalig die künstliche Besamung in grösserem Maße durch und versuchte auch die Verdünnung des Samens, sowie den Transport über grössere Entfernungen.

Die Forschungen über geeignete Verdünnungsflüssigkeiten wurden in der Folgezeit fortgeführt, vor allem über salinische, physiologische Flüssigkeiten (physiologische Kochsalzlösung, Tyrodelösung, Ringerlösung u.a.). Diese Verdünnungsmittel, wie sie S c h ö t t l e, W e b e r, K ü s t u.a. (zit. nach 30) zur Anwendung brachten, waren in ihrer Wirkung noch spermazid, d.h. sie steigerten die Bewegungsaktivität, verkürzten damit die absolute Lebensdauer der Spermien ausserhalb des Tierkörpers und konnten aus diesen Gründen erst unmittelbar vor Durchführung der Besamung zugesetzt werden. Diese Verdünnung an Ort und Stelle kann jedoch kaum so exakt durchgeführt werden, daß das Sperma durch Unsauberkeit und krasser Temperaturschwankungen nicht geschädigt wird.

Die Entwicklung der systematischen Verdünnungsforschung begann erst in diesem Jahrhundert. Wegbereiter auf diesem Gebiet waren neben W i l l i a m s, S a v a g e, L a g e r l ö f (zit. nach 30) und neben den Japanern Y a m a n e, O c h i und S a t o (zit. nach 30) besonders die deutschen Forscher R e d e n z (zit. nach 30) und R o e m m e l e (59).

R e d e n z und R o e m m e l e fanden 1925/26, daß reine Traubenzuckerlösungen und Phosphatpuffer günstig auf Bullenspermien wirkten. Weite Verbreitung fand der von M i l o w a n o w (zit. nach 30) eingeführte Glukosephosphatpuffer. Dieser übertraf in seiner Wirkung die ebenfalls von

M i l o w a n o w angegebenen Glukose-Sulfat- und Glukose-Tartrat-Puffer (13). G ö t z e (30) verbesserte den russischen Glukose-Phosphat-Puffer, der von der Firma Riedel de Haen geliefert wird und der heute noch mit Eidotter Verwendung findet.

Alle oben besprochenen Verdüner waren zwar geeignet, durch Volumensvermehrung eine bessere Dosierung der Ejakulate zu gewährleisten; sie waren jedoch nicht in der Lage, die Lebensdauer der Spermien zu verlängern.

Lebensverlängerung kann durch Herabsetzen der biochemischen Vorgänge innerhalb der Samenzelle bei Temperaturen wenig über dem Gefrierpunkt erreicht werden. Man nennt diese Erscheinung Kälteanabiose (Kälteschlaf). Dadurch werden die den Spermien mitgegebenen Energiereserven während der Aufbewahrung und des Transportes nicht so schnell verbraucht. Ferner ist eine Samenzelle in der Lage, aus ihrer Umgebung Nährstoffe, insbesondere Glukose, aufzunehmen.

Durch Zusatz von Eidotter frischer Hühnereier zum Verdüner konnten P h i l i p p s (54) und P h i l i p p s und L a r d y (55) die Lebensdauer von Bullensperma verlängern und die Befruchtungssätze erhöhen. Die Pufferung erfolgte mit dem Phosphatverdüner nach Philipps: $0,2 \text{ g } \text{K}_2\text{H}_2\text{P}_4\text{O}_4$, $2,0 \text{ g } \text{Na}_2\text{HPO}_4$, aqua dest. ad 100. Damit war die Grundlage für neue Spermakonservierungsmethoden gegeben.

Auf der von S c h e r s t e n (67) festgestellten Tatsache fussend, daß Natriumcitrat günstig auf Bullenspermien wirkt, stellten die amerikanischen Forscher S a l i s b u r y, F u l l e r und W i l l e t (64) Versuche mit Natriumcitratverdüner unter Zusatz von 20–25% Eidotter an. Seitdem finden die Natriumcitratverdüner sehr viel Verwendung, weil sie neben ihrem lebensverlängernden Effekt auch höhere Verdünnungsgrade als bisher zulassen. Trotz der günstigen Ergebnisse wurde, in der Absicht noch weitere Verbesserungen zu erreichen, die Forschungsarbeit über Samenverdünnung mit verschiedensten Stoffen tierischer und pflanzlicher Herkunft fortgeführt.

Um Spermatozoen im Blutserum lebend zu erhalten, sind immer wieder von verschiedenen Autoren Versuche angestellt worden. V a t h e u e r (zit. nach K r i i s a (49)) gibt an, mit inaktiviertem Pferdeserum dieselben Befruchtungsergebnisse erzielt zu haben wie bei Verdünnung des Samens mit dem Glukosephosphatverdüner. Auch K r i i s a (49) stellte

Versuche mit inaktiviertem Pferdeserum an. Er erhielt beim Glukosephosphat-Verdüner eine Befruchtungsquote von 65,85 %, beim Serumverdünner von 56,81%, obwohl die Spermien in vitro bei derselben Verdünnung gute Beweglichkeit und Lebensfähigkeit zeigten.

K o r d t s und S c h o l t y s s e k (48) stellten fest, daß von allen spezifischen Seren das Pferdeserum am besten geeignet sei, weil es am wenigsten toxisch auf das Sperma wirke. Allerdings träten oft Agglutinationen auf, besonders bei höheren Verdünnungen, welche schlechte Befruchtungsergebnisse bedingten. A s h e r und K ä m m e r e r (6), die unter anderem auch fabrikmässig hergestellte Blutsera prüften, warnen sogar vor der Spermattoxizität des Serums.

K o r d t s und S c h o l t y s s e k (48), sowie A s h e r und K ä m m e r e r (6) untersuchten auch den Einfluß von Periston auf das Sperma. Periston ist eine kolloidhaltige Lösung, die Bluteigenschaften zeigt, wegen mehrerer Salze und einer 3,5%igen Lösung von Polyvinylpyrrolidon blutisotonisch ist und in der Humanmedizin als Blutersatzflüssigkeit dient. Bullensperma konnte damit erfolgreicher verdünnt werden als mit Blutserum. Dabei zeigte das sauer reagierende Periston bessere Konservierungseigenschaften, wenn es neutralisiert wurde. Kammerwasser des Auges (Humor aquaeus) erwies sich als gutes Verdünnungsmittel (6). Hinsichtlich Beweglichkeit und Lebensdauer der Spermien übertraf das Kammerwasser von Pferden das von anderen Tieren. Wurde es mit Natriumcitrat verdünnt, so verminderte es die Lebensdauer um 50%.

P h i l i p p s und L a r d y (56) befaßten sich mit den verschiedenen Bestandteilen des Hühnereies hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Spermien und berichten, daß Eidotter oder Eiweiß allein für das Sperma nicht günstig sei. Eidotter habe einen pH-Wert von 6,0, Ganzei von 7,5 - 7,8 und Eiweiß von 8,0 - 9,0. D u n n und B r a t t o n (19) ersetzten nun den Eidotter von Pufferlösungen durch Ganzei. Die Chalazae wurden steril entfernt, das Ei im "Waring blender" durchmischt und danach sofort ein Teil Ganzei drei Teilen Pufferlösung, bestehend aus 1,93% Natriumcitratdihydrat und 0,4% Succinylsulfothiazon, zugesetzt. Dabei stellte sich heraus, daß die Ganzeipräparate wegen der hohen pH-Werte (7,8-7,9) spermacid sind. Erst nach Zusatz verschiedener Säuren konnten die Werte des Standardpräparates (2,9% Eidottersulfanilamidcitrat) annähernd erreicht werden. Dabei sollen die Spermien im Ganzei verdünner mikroskopisch sichtbarer und beweglicher sein (D u n n und B r a t t o n (20)).

Bei in-vivo-Versuchen stand die Befruchtungsquote des Ganzei verdünners der des Standard verdünners ebenfalls nur wenig nach (D u n n und B r a t t o n (19), D u n n und Mitarb. (21)).

Im Laufe der Zeit wurden von verschiedenen pharmazeutischen Firmen Samen verdünnungsmittel auf der Basis von Natriumcitrat auf den Markt gebracht, von denen sich der "Citrat verdüner" (Riedel de Haen) und der "Spermasol verdüner" (Mack-Illertissen) besonders bewährt haben. Allerdings ist bei diesen Samenpuffern ein Eidotterzusatz von etwa 20% unumgänglich.

Trotz der überaus grossen Vorteile des Eidotters als Schutzkolloid mit hervorragenden Konservierungseigenschaften wird von seiten der Forschung und vor allem der Praxis gefordert, den Eidotter durch andere Medien zu ersetzen. Das Zusetzen von Eidotter zum Verdüner ist in praxi sehr umständlich und zeitraubend. Ferner sind die verwendeten Pipetten schlecht von Eidotterresten zu reinigen und schwer zu sterilisieren. Bei geringerem Karotingehalt des zur Verdünnung herangezogenen Eidotters sollen nach H o e l z e r und H a n s k e (35) die spermakonservierenden Eigenschaften gering sein oder gänzlich verloren gehen. Nach A e h n e l t (1) zeigt Eidotter wegen jahreszeitlicher und fütterungsmäßiger Schwankungen nicht immer eine konstante Wirkung auf die Spermien, ist nicht keimfrei, nicht sterilisierbar und stellt für Bakterien einen günstigen Nährboden dar. Nach Ansicht K a m p s c h m i d t 's und Mitarb. (44) kommt als der für die Samenkonservierung verantwortliche Bestandteil des Eidotters der Lipoid-Protein-Komplex in Betracht, der hauptsächlich aus Phosphorlipoiden, Lecithin und Cephalin besteht.

Auf Grund dieser Erwägungen wurden in der Klinik für Geburtshilfe und Rinderkrankheiten der Tierärztlichen Hochschule Hannover mehrere Dissertationen abgefaßt, die die Prüfung der Möglichkeit eines Eidotterersatzes durch andere Medien zum Ziele hatten. B r e n n e c k e (14) verglich Serumzusatz mit Eidotterzusatz zum Kaliumnatriumcitrat verdüner nach Götze und konnte feststellen, daß sich der Eidotterzusatz in allen Fällen dem Serumzusatz als überlegen erweist und daß bei Verwendung von Sera verschiedener Pferde erhebliche Schwankungen auftreten. Neben sämtlichen von R u l l f e s (63) geprüften Hoden- und Nebenhodenextrakten waren auch Weißdextrin, Tafalei und Dextran spermafeindlich.

Allantois- und Amnionsflüssigkeit sowie Pressaft von verschiedenen alten

Rinderembryonen erwiesen sich nach I d e l b e r g e r (38) ebenfalls spermazid, wenn sie von jungen Embryonen stammten. Jedoch nahm mit zunehmendem Alter der benutzten Rinderembryonen bis zum 75. Tag die Spermareundlichkeit im gleichen Grade zu, um nach dem Höhepunkt bei etwa 90 - 100 Tagen bis zum Alter von 5 Monaten der Embryonen stetig abzunehmen und nach diesem Zeitpunkt in Spermafeindlichkeit umzuschlagen. Zur Zeit der optimalen Spermareundlichkeit konnte eine Verbesserung der Werte um 10% bei Zusatz der Flüssigkeiten zum Eidotternatriumcitrat erreicht werden. Die Möglichkeit eines vollwertigen Ersatzes des Eidotters durch Salze der Acrylsäure scheint auf Grund der von H a n n e c k (31) durchgeführten Versuche nicht gegeben.

Der Eidotterzusatz zum Spermasol- und Natriumcitratverdünner konnte durch die von W o l f e r t z (86) geprüften Pflanzenkolloide wie Tyloselösung, Natriumalginatlösung, Agar-Agar-Lösung, Dextrinlösung, Auszug der viskosen Stoffe aus der Eibischwurzel sowie der Schleimstoffe aus Quitten- und Leinsamen nicht ersetzt werden.

Um eine Eidotternatriumcitratlösung zu erhalten, in der kein Eidotterniederschlag auftritt, die frei von bakteriellen Verunreinigungen ist und einige Zeit gekühlt aufbewahrt werden kann, stellte H e r r i c k (32) mehrere Versuche an. Frischer Eidotter wurde z.B. mitsamt der Eimembran im Handhomogenisator homogenisiert und nach Beimischung von 3,0%igem Natriumcitrat und 0,3% Sulfanilamid im Vakuum bei möglichst niedriger Temperatur getrocknet. Danach wurden auf drei Teile Dotter fünf Teile aqua dest. hinzugegeben und die Masse durch ein steriles Quarktuch filtriert, wobei 78% des ursprünglichen Volumens zurückgewonnen wurden. In einem anderen Versuch wurden drei Teile Dotter zu fünf Teilen einer 3,0%igen Natriumcitratlösung, die 0,3% Sulfanilamid enthielt, zugesetzt und 30 Minuten bei 62° C unter ständiger Bewegung pasteurisiert und danach in sterilen Flaschen bei 4 bis 5° C aufbewahrt. Diese Lösung blieb keimfrei und konnte noch nach 30 Tagen mit Erfolg verwendet werden. Diese von H e r r i c k ausgearbeiteten Verfahren dürften aber nur theoretische Bedeutung erlangt haben, da deren Anwendung für die Praxis gegenüber anderen günstigen Verdünnern zu teuer ist.

S a l i s b u r y (65) stellte einen Verdünner aus 9-11 Tage bebrüteten Eiern her und verglich sie mit Eidottercitrat. Dieser Verdünner war in der Erhaltung der Lebensfähigkeit der Spermatozoen bei Aufbewahrung bei einer

Temperatur von 5° C dem Eidottercitrat nur geringgradig überlegen. Eine Wertverbesserung konnte hauptsächlich bei Ejakulaten von Stieren mit niedrigerer Fruchtbarkeit erzielt werden. Ein Verdünner, der nur aus dem Pressaft des embryonalen Fruchtkörpers hergestellt war, zeigte ebenfalls keine bessere Wirkung. Der 9-Tage-Bruteiverdünner bildete mehr Milchsäure bei der Aufbewahrung als der Eidottercitratverdünner. Ebenso wurde in diesem Verdünner eine grössere Menge Glukose, die bei der Aufbewahrung verbraucht wurde, als Milchsäure gefunden. Dies läßt vermuten, daß dieser Verdünner die Glykolyse der Spermatozoen fördert.

Von den fabrikmässig hergestellten Trockenverdünnern interessieren hauptsächlich die, welche biologische Substanzen enthalten. P h i l i p p s und S p i t z e r (57) entwickelten 1946 einen synthetischen Verdünner, dessen Hauptbestandteile frischgereinigte Lipide, spezifische Zucker (Glukose und Galaktose), ein Puffersystem, eine Schleimsubstanz, um die geeignete physikalische Viskosität zu erreichen, und ein Antibiotikum waren. B a y l e y und Mitarb. (9) prüften den Philipp-Spitzer-Verdünner und stellten fest, daß dessen Befruchtungshundertsatz um 15% unter dem als Vergleichsflüssigkeit dienenden Eidottercitratpuffer lag. Von allen von P u r s l e y und Mitarb. (58) mit Eidottercitrat verglichenen Verdünnern schnitt der mit Natriumcitrat und Asolectin modifizierte Philipps-Spitzer-Verdünner mit 190,6 Stunden Lebensdauer gegenüber 174,2 Stunden bei Eidottercitrat besser ab. Der modifizierte Originalverdünner nach Philipps und Spitzer setzt sich wie folgt zusammen: 1,2 g Glukose, 0,4 g Galaktose, 0,4 g Kaliumphosphat, 0,4 g Natriumphosphat, 4,0 g Asolectin, 6,0 g Acaciagummi, 66 mg Sulfonamid, 200 g aqua dest., 20 ml Eidotter.

Bei den in Deutschland bisher hergestellten und von A e h n e l t (2) geprüften synthetischen Verdünnern konnte bei keinem der Präparate auf die Zugabe von Eidotter verzichtet werden. In wenigen Fällen wurden die Werte der Kontrollflüssigkeit Eidotterspermasol nur erreicht bzw. übertroffen, wenn diesen Verdünnern ebenfalls Eidotter zugesetzt wurde. Der Spermaverdünner der Behringwerke in Trockenform, der ein Puffersystem, Lecithine, Glyzeride, Cholesterol, Gelatine und antibiotisch wirkende Zusätze enthält und auf einen pH-Wert von 6,9 eingestellt ist, wird durch Eidotterzusatz nur unerheblich verbessert und erreicht die Werte von Eidotterspermasol nicht.

Der von der Firma Riedel de Haen aus dem Citratpuffer unter Zusatz von organischen und anorganischen Phosphorverbindungen, Gelatine und einem Sulfonamid entwickelte Trockenverdünner ergibt nach Eidottierzusatz zum Teil eine leichte Überlegenheit gegenüber Eidotterspermasol.

Im Gegensatz zu den Angaben von B o g u t h (11), daß die bei Konservierungsversuchen mit Stiersperma in Nährlösungen übliche Beimischung von 20% Eidotter sich durch 0,1% relativ plasmalogenreicher Acetalphosphatide ersetzen ließe, geht aus den Prüfungsergebnissen A e h n e l t 's (2) deutlich hervor, daß der mit Plasmalogenzusatz hergestellte Verdünner "Dilopten" der Firma Merck, Darmstadt, durch Beimischung von Eigelb bedeutend verbessert werden kann. Eidotter-Dilopten ist dem Eidotterspermasol sogar geringgradig überlegen, besonders bei Aufbewahrungszeiten bis zu 5 Tagen. Laut B o g u t h (12) kann während oder nach der Herstellung von Dilopten eine Sterilisation durchgeführt, eine unbegrenzte Haltbarkeit des Trockenverdünners damit jedoch nicht garantiert werden.

Besagtes Plasmalogen ist ein Aldehyd mit Lipoidcharakter und kommt im Blutserum, in den Stromata der Erythrozyten, im Fruchtwasser, im Eigelb und in der Milch vor. Der Plasmalogengehalt in den Geschlechtstraktepithelien der weissen Maus ist weitgehend von der Ovarialzyklusfunktion abhängig und stimmt mit der Follikulinkurve überein (82). B o g u t h (11) konnte Plasmalogen im Stiersperma nachweisen. Nach seinen Untersuchungen entfallen auf 1 ccm Bullensperma 0,3 - 0,9 mg Plasmalogen. Rassenunterschiede haben auf die Werte keinen Einfluß. Wohl aber kann der Plasmalogengehalt des Spermas in pathologischen Fällen signifikant erniedrigt sein.

Von besonderem Interesse erscheint noch, daß auch das Spermaplasma Plasmalogen enthält, und zwar 1/3 des Gesamtplasmalogengehalts. Als plasmalogenreiche Acetalphosphatide führt B o g u t h auf: Muskel 10-12%, Gehirn 8-9%, Leber 1%, Eidotter 0,1% = 6-10 mg, nach 11-tägiger Bebrütung des Eidotters 25 mg, analog keimender Pflanzensamen.

Die Bedeutung des Plasmalogengehalts im Sperma für die Lebensvorgänge der Spermien konnte bis jetzt noch nicht exakt erforscht werden. Vermutlich hat Plasmalogen einen günstigen Einfluß auf die Vitalität der Spermien, erreicht jedoch die puffernde Wirkung und die Schutzkolloideigenschaften des Eidotters nicht.

1949 veröffentlichte M i h a ĭ l o v (52) die Ergebnisse seiner Samen-

Verdünnungsversuche mit Milch von verschiedenen Tierarten. Mit Stutenmilch erreichte er eine Lebensdauer der Spermien von 156 Stunden, mit Schafmilch 132 Stunden, mit Kuh- und Ziegenmilch 108 Stunden, mit Glukoselösung nur 83 Stunden. Als optimales Verdünnungsverhältnis ergab sich bei Stutenmilch 1:4 - 1:25, bei Kuh- und Ziegenmilch nur 1:3 - 1:8.

In Amerika erprobten kurze Zeit später Th a k e r und A l m q u i s t (74,5) die Verdünnung des Bullensamens mit pasteurisierter, homogenisierter Vollmilch und mit pasteurisierter Magermilch und erzielten Befruchtungssätze, die 4-7% über denen der Eidottercitratverdünner lagen. Ähnliche Ergebnisse erhielten D r e h e r und W e b b (18) sowie F l e r c h i n g e r und Mitarb. (24).

A l m q u i s t (3) stellte fest, daß der Unterschied des Besamungserfolges nach Milch- und Eidottercitratverdünnung des Samens von Bullen mit hoher Fruchtbarkeit geringer ist als von Bullen mit niedriger Fruchtbarkeit. Durch Antibiotikazusätze (Penicillin, Streptomycin) konnte er die Fruchtbarkeit des Milchverdünners deutlich verbessern. Aus Versuchen F i o r e n t i n o s (24) geht hervor, daß bei Milchverdünnern niedrigere Antibiotikazusätze günstiger sind. Er bestätigt, daß Spermien in total entrahmter Milch gegenüber der gebräuchlichen Eidottercitratverdünnungsflüssigkeit längere Lebensdauer und Bewegungsaktivität aufweisen.

Hinsichtlich des Verdünnungsgrades führen S c h m i d t und J e n i c h e n (68) an, daß sogenannte "konservierungsnegativ wirksame" Zusätze (Phosphatpuffer, Milchserum, Blutserum) ihre lebensverkürzende Wirkung mit zunehmender Höhe des Verdünnungsgrades vervielfachen. Aber auch konservierungspositiv wirksame Zusätze wie Eidotterphosphat, Eidottercitrat zeigen ein Nachlassen ihrer lebensverlängernden Wirkung bei zunehmender Höhe des Verdünnungsgrades. Der Konservierungseffekt bei Zugabe gekochter Vollmilch erfuhr jedoch mit steigendem Verdünnungsgrad kaum eine Beeinflussung.

Erfahrungsgemäß kann zur Spermaverdünnung nur solche Milch verwendet werden, die 10 Minuten auf 92° C erhitzt worden war. In unerhitzter Milch werden die Spermien in 1-2 Tagen unbeweglich. Der Grund für die Toxizität der unerhitzten Milch auf das Sperma wurde von Th a k e r und Mitarb. (75) in den Milchproteinen gesucht. Nach ihren Feststellungen ist mehr als ein spermacider Faktor in den verschiedenen geprüften Proteinfractionen der Milch enthalten. In kasein- und proteinfreiem Milchserum wurde der toxische Faktor nicht gefunden, wohl aber in den albuminenthaltenden Fractionen.

Eine Zunahme der Lebensdauer der Spermien ergab sich durch Erhitzen der Euglobulin- und Pseudoglobulinfraktion.

Auf Grund dieser Versuche konnten F l i p s e und Mitarb. (26) den toxischen Faktor der Milch als Laktenin identifizieren. Durch Zugabe von 1,0 mg Cysteinhydrochlorid pro 1 ml ungekochter Milch konnten J o h n s o n und Mitarb. (41) den spermaciden Faktor ausschalten. Nach ihren Versuchen zeigte Glutathion das gleiche Ergebnis, während Methionin diesbezüglich wirkungslos blieb.

Die von T h a k e r und A l m q u i s t (74) durchgeführten in-vivo-Versuche zeigten, daß der Milchverdünner wegen seiner geringen Viskosität zu Sedimentbildung neigt. Durch in-vitro-Versuche konnten A l m - q u i s t und Mitarb. (4) zeigen, daß durch Zugabe von 1% Maisstärke zum Milchverdünner ähnliche Viskositätsverhältnisse wie beim Eidottercitratverdünner erreicht werden. Auf die Fruchtbarkeit hat die Maisstärke keinen Einfluß.

C o l l i n s (16) stellte evaporierte Milch durch Zugabe von einem gleichen Teil gekochtem aqua bidest. zur nahezu normalen Isotonizität ein und verglich sie mit gekochter homogenisierter Vollmilch und mit Eidottercitrat. Bei in-vitro-Versuchen zeigte sich kein wesentlicher Unterschied bei den Verdünnern. Der Befruchtungserfolg bei Verwendung evaporierter Milch jedoch war um fast 15% niedriger als bei den beiden anderen Verdünnern.

H u r s t und L a M a s t e r (37) verglichen frische pasteurisierte Magermilch, die 10 Minuten auf 92-95° C erhitzt worden war mit gefrorenem Eidottercitratverdünner und gefrorener Magermilch, welche beide vor ihrer Verwendung einen Monat lang bei -30° C gelagert waren. An einem allerdings geringen Tiermaterial ergab die Pufferung mit gefrorener Magermilch einen Befruchtungserfolg von 70%, der gefrorene Eidottercitratverdünner 62,5 % und Magermilch nur 30 %.

S o b e k (70) berichtet, daß mit Milch-Eidotter und Milch-Eidottercitrat als Samenverdünnungsflüssigkeit zufriedenstellende Ergebnisse erreichbar seien. Während die Befruchtungsergebnisse mit Milch-Eidotter um 5 % besser gewesen sein sollen als mit Eidottercitrat, waren die Resultate mit Milch-Citrat unbefriedigend.

J a c q u e t und C a s s o u (39) konnten die Lebensdauer der Sper-

mien dadurch verlängern, daß sie statt des bisher verwendeten Eidotter-citratverdünners ein Eidotter-Milch-Puffersystem verwendeten. Sie empfahlen die Verwendung von Milch besonders wegen ihrer Billigkeit und ihrer unbeschränkten Haltbarkeit, nachdem entrahmte Milch in Metallbehältern sterilisiert wurde. Die Befruchtungserfolge sprechen sehr zu Gunsten des Eidotter-Milchverdünners. Dabei ist unbedingt zu berücksichtigen, daß die Besamungen mit Eidottermilchsamen in dem für die Fruchtbarkeit günstigeren Zeitraum von Mai bis November (Weidezeit) ausgeführt wurden, während mit Eidottercitrat von Januar bis Juli (1951) besamt wurde.

Daß beim Eidottermilchverdünner die volle Befruchtungsfähigkeit (75 % V) mindestens eine Woche erhalten bleibt, behauptet W e i s s (84). Er hält Vollmilch insofern für ungeeignet, als sie wegen der Fettkügelchen die mikroskopische Spermauntersuchung sehr erschwert. Zu 100 ccm sterilisierter Milch werden 2 ccm Eidotter gegeben. Durch Zugabe von Streptomycinlösung konnte die Wirkung der die Milchsäuerung bewirkenden Bakterien über einen Zeitraum von 15 Tagen gehemmt werden. Die mit Eidottermilch erzielten Befruchtungsquoten fielen jedoch im Gegensatz zu Eidottercitrat stark ab.

Von grossem Interesse sind die Vergleiche, die P e t e r s (53) zwischen Eidotterspermasol und Eidottermilch anstellte. Mit Milch allein konnte er im Gegensatz zu den amerikanischen Forschern, bes. Almquist und Mitarbeiter, keine befriedigenden Ergebnisse erzielen, obwohl der pH-Wert der Milch ($\text{pH} = 6,6 - 6,8$) auch dem frischen gut befruchtungsfähigen Samen entspricht. Dabei muß jedoch berücksichtigt werden, daß den amerikanischen Forschern nur der Eidottercitratverdünner, dem das Eidotterspermasol überlegen ist, als Vergleichsbasis diente. P e t e r s gibt als optimalen Wert einen Zusatz von 10% Eidotter zum Milchverdünner an. Die mit Eidottermilch erzielten Befruchtungssätze stehen denen mit Eidotterspermasol nicht nach.

A e h n e l t (2) warnt jedoch vor der Einführung der Milch als Verdünner oder Verdünnerzusatz, da Milch als biologisches Medium ähnliche Nachteile hat wie Eidotter und somit ein weiterer Unsicherheitsfaktor eingeführt wird.

Von den Überlegungen ausgehend, daß sich resuspendiertes Trockenmilchpulver für Spermaverdünner besonders wegen seiner Haltbarkeit besser eignen könnte als erhitzte Milch, stellten M a r i o n und O l s o n (51)

Versuche darüber an. Verwendung fanden Walzen- und Sprühmagermilchpulver ("low and high heat skim milk powder"). Es stellte sich heraus, daß Walzentrockenmilch nach der Resuspension aufgekocht werden mußte, ehe sie als passende Verdünnerflüssigkeit dienen konnte. Durch Kochen konnte die Verwendungsfähigkeit des Sprühmagermilchpulvers nicht erhöht werden. Die Spermienlebensfähigkeit wurde letzten Endes in ungekochter resuspendierter Sprühmagermilch genau so gut erhalten wie im Eidottercitrat, gekochter Frischmilch oder gekochter Walzenmagermilch.

Die in-vitro-Versuche von V e i g a und Mitarb. (81) haben ebenfalls gezeigt, daß pulverisierte Trockenmilch, die in aqua bidest. im Verhältnis 1:8 resuspendiert, einige Male aufgekocht und filtriert wurde, als Samenverdünner mit Eidottercitrat günstig konkurrieren kann. Das aufgelöste Milchpulver hatte einen pH-Wert zwischen 5 und 6 und wurde zu Samenverdünnungen von 1:4 - 1:10 verwendet.

Ähnliche Ergebnisse erhielten J a c q u e t und C a s s o u (40), die das Trockenmilchpulver "Leciphos 123" kurz vor Gebrauch mit aqua bidest. 1:10 lösten. Durch Zusatz von 10% Eidotter konnte die Verdünnerflüssigkeit verbessert und die Verwendungsfähigkeit des damit verdünnten Spermas auf 6 Tage hinaufgesetzt werden. Der klassische Eidottercitratverdünner wurde vollkommen aufgegeben, weil der Eidottertrockenmilchverdünner die Fruchtbarkeit des Spermas zu steigern und im Laufe des Jahres eine regelmäßigere Fruchtbarkeit zu sichern scheint. Die Erfahrungen mit dem neuen Verdünner basieren auf 50.000 mit Erfolg besamten Kühen.

Nach K a m p s c h m i d t und Mitarb. (45) begünstigen geringere Veränderungen in der Behandlung von Verdünnungsmedien das Absetzen von Eidotter und Samenplasma in Verdünnungslösungen. Auf die Beweglichkeit und Lebensfähigkeit der Spermatozoen, sowie auf den Befruchtungserfolg habe dieses Phänomen keinen Einfluß. Auch beim Milchverdünner liegen die Viskositätsverhältnisse so, daß bei der Lagerung eine Sedimentation auftritt (A l m - q u i s t (4)).

In den USA werden durch Zugabe von Acaciagummi bzw. 1% Maisstärke die betreffenden zur Sedimentation neigenden Verdünnungsmedien auf optimale Viskositätsverhältnisse eingestellt. In den europäischen Ländern findet vorwiegend Gelatine Verwendung.

Schon im Jahre 1937 setzten M i l o w a n o w, N a g o r n y, S i v o - k o n und M a l a k o w (zit. nach G ö t z e (30)) die vorher von an-

deren Forschern erkannte Tatsache, daß die Spermien in elektrolytfreier Gelatine eingebettet werden können, in die Praxis um. Die Spermien werden durch die Gelatinierung stillgelegt bzw. in ihrer Beweglichkeit beschränkt, ihr Stoffwechsel und ihre Kälteempfindlichkeit herabgesetzt (G ö t z e (30)).

1939 verwendete in Dänemark S ø r e n s e n (73) nach Zufügen von 5% Gelatine den von Milowanow angegebenen Glukose-Phosphat-Sulfat-Verdüner, dem er noch 10% Eidotter zusetzte. Dazu führt G ö t z e (30) an, daß das 1:3 - 1:4 verdünnte und gelatinierte Sperma schon nach 72 Stunden zum größten Teil abgestorben und deshalb schnell zu verbrauchen sei, während der Gelatinezusatz von 2,14 % beim Verdüner nach Knoop wesentlich zur Lebensverlängerung der Spermien beitrug.

B r a t a n o f f (13) berichtete sogar von einem Gelatinezusatz von 10% zu einem von Bonadonna entwickelten Puffersystem. R o t t e n s t e i n und W i b l i n g (60) kamen nach 4.200 Inseminationen zu dem Ergebnis, daß ungelatiniertes Sperma eine etwas höhere Befruchtungsquote zeigte, als das mit einem Zusatz von 3,9 % Gelatine versehene Natriumcitrat-Glukose-Sulfanilamid.

Zu den Feststellungen H o e l z e r s (34), daß das sich in dem meist verwendeten Spermasolverdüner befindliche elektrolytfreie Gelatineabbauprodukt als Schutzkolloid die Wirkung des Eidotters erhöhe, bei niederen Temperaturen eine Sedimentierung der Samenzellen verhindere und vor allem der Samen beim Transport ruhig gestellt werde, kommen noch die an vielen Besamungsstationen gemachten Erfahrungen, daß Gelatinezusätze sich bei höheren Verdünnungsgraden ungünstig auswirkten.

1940 führte B o n a d o n n a (zit. nach G ö t z e (30)) das Glykokoll (Glycin) in die Reihe der Verdünnungsmittel ein. Durch einen Glykokollzusatz von 2% konnte er sämtliche verglichenen Verdünnungslösungen etwas verbessern. W i n t e r (85) verglich Glykokoll- mit Glukosezusätzen bei verschiedenen Verdünnern, konnte jedoch die von Bonadonna gemachten Angaben nicht bestätigen.

Durch die Tatsache aufmerksam geworden, daß ein Eidotter-Puffersystem wesentlich bessere Werte mit einem Gelatinezusatz aufweist als ohne einen solchen und daß im Gelatineprotein 25,5% Glykokoll und 23,6% Prolin und Hydroprolin enthalten sind, stellten K n o o p und K r a u s s (47) ein Puffersystem aus 1,09% Glykokoll oder 1-Prolin, 0,2% Dinatriumhydro-

genphosphat, 0,08% Kaliumdihydrogenphosphat und einem gleichen Volumensanteil Eidotter her, um den konservierungspositiven Faktor in der Gelatine zu identifizieren. Gegenüber dem Gelatine-Eidotter-Puffersystem waren im Aminosäure-Verdünnern nach 12 Tagen Lagerung durchschnittlich 36% mehr lebende Spermien enthalten und 49% mehr als bei einem Eidotter-Puffersystem ohne Gelatine.

An Seeigelspermien beobachteten T y l e r und A t k i n s o n (78), daß ihre Lebensdauer mit fallender Spermiedichte abnimmt. Durch Zugabe von 0,1 - 0,0005 Molen Glykokoll konnten die Spermien in einem Stadium höherer Aktivität gehalten werden. Dabei lag die Vermutung nahe, daß Glykokoll einen metabolischen Effekt auf die Spermien ausübe, der vor allem von der Aminogruppe der Aminosäure ausgehen soll.

Ein Beweis konnte dafür nicht erbracht werden, weil das aus dem Glykokoll gebildete Ammoniak in zu kleinen Mengen gebildet wird. Des weiteren wird dem Glykokoll eine gewisse spermaschützende Wirkung gegen schädigende Strahleneinflüsse zugeschrieben, wie aus Experimenten von G i e s e und W e l l s (28) zu entnehmen ist. T y l e r und T a n a b e (79) konnten 1952 feststellen, daß die Zugabe von Glykokoll bei Konzentrationen von 0,009 - 0,038 Molen zu einer ausgeglichenen Salzlösung die Beweglichkeit und Lebensdauer der Bullenspermien bei 38° C beträchtlich vergrößert. Die Wirkung sei erst in tausendfacher Samenverdünnung signifikant. Beim Eidottercitratverdünner konnte weder bei 4° C noch bei 38,6° C ein signifikanter Effekt erzielt werden. R o y und B i s h o p (61) stellten einen Glycinverdünner her, bestehend aus einem Teil 4 bzw. 6%iger Glykokoll-Lösung und einem Teil Eidotter, der sich viel wirkungsvoller als Eidottercitrat oder Eidotterphosphat erwies. Zugaben von kleinen Mengen Fruktose oder Arginin zu diesem Verdünner sollen zur weiteren Verlängerung der Lebensdauer beigetragen haben.

F l i p s e und A l m q u i s t (25) konnten bei einem Verdünner, bestehend aus gleichen Teilen erhitzter Magermilch und 0,5 moliger Glykokoll-Lösung, eine Lebensdauer der Spermien von 22 Tagen erzielen, gegenüber 14 Tagen bei einem Verdünner mit erhitzter Magermilch allein. Zusätze von Cystein Fruktose, Arginin, Glycerin oder Lipoprotein zeigten keine signifikante Verbesserung des Milch-Glykokollverdünners. Ein Verdünner aus gleichen Volumina Eidotter und 0,5 moliger Glykokoll-Lösung war noch wirkungsvoller als Milch-Glykokoll, besonders während der zweiten Woche. Versuche über Fruktoseverbrauch und Milchsäurebildung zeigten keinen ausgesproche-

nen Effekt des Glykokolls auf die Glykolyse. Nach Verwendung von Glykokoll mit C^{14} wurden C^{14} -Atome in den Samenzellen gefunden. Demnach dürfte es sicher sein, daß das Glykokoll beim Stoffwechselvorgang abgebaut wird.

Durch den günstigen Einfluß des Glykokolls auf die Bewegungsaktivität der Spermien aufmerksam geworden, wurde der Einfluß mehrerer anderer Aminosäuren bzw. Peptonen studiert. M i l o w a n o w (zit. nach G ö t z e (30)) konnte 1940 durch Zusatz von wasserfreiem Pepton (Witte) zum Glukosesulfit- bzw. zum Glukosecitratpuffer eine geringgradige Verbesserung der Vermögen erzielen. S a r k a r (66) bestimmte die Konzentrationen von 11 Aminosäuren im Bullensperma und kam zu dem Ergebnis, daß das Aminosäureverhältnis in den Spermien sehr ähnlich dem im Plasma ist, ausgenommen bei Arginin, bei Leuzin und bei Tryptophan.

T o s i c und W a l t o n (77) und T o s i c (76) stellten fest, daß der aus dem Eidotter von gewaschenen, resuspendierten Spermien gebildete Hemmstoff Wasserstoffperoxyd ist und daß die Spermien wenig Möglichkeit haben, H_2O_2 zu speichern oder unschädlich zu machen. Dieser Hemmstoff wird jedoch nur bei aeroben Bedingungen und in Gegenwart von l-Tryptophan, l-Phenylalanin und l-Thyrosin beim Stoffwechsel durch oxidative Desaminierung aus einer sich im Eidotter befindlichen Substanz gebildet, die noch Spuren von Glukosaminen enthält. Neben Wasserstoffperoxyd tritt auch als Stoffwechselendprodukt Ammoniak auf. Bei Gegenwart von dl-Alanin, dl-Serin, l-Cystin, dl-Valin, l-Leuzin, l-Arginin, l-Lysin, l-Histidin, l-Asparaginsäure und l-Glutaminsäure blieb die Bildung von NH_3 und H_2O_2 aus, sowie die Hemmung der Bewegungs- und Stoffwechselaktivität der Spermien. Die Ergebnisse, daß bei Anwesenheit lebender Spermatozoen H_2O_2 gebildet wird, lassen vermuten, daß bei Sauerstoff als Wasserstoffakzeptor eine fermentative Dehydrogenisierung und Desaminierung einsetzt:

$R \cdot CH_2 \cdot CH(NH_2) \cdot COOH + O_2 + H_2O = R \cdot CH_2 \cdot CO \cdot COOH + H_2O_2 + NH_3$, wobei R nur eine Phenyl-, p-Hydroxylphenyl- oder Indoxylgruppe sein kann. Die l-Aminosäureoxydase lebender Bullenspermien, welche nur die drei besagten Aminosäuren angreift, scheint daher mehr eine spezifische, als eine l-Aminosäureoxydase zu sein.

L o r e n z und T y l e r (50) wiesen nach, daß Conalbumin und Hydroxylamino-ovo-mycoid auf die Lebensdauer der Spermien vom Haushahn eine größere Wirkung ausübten als andere Proteine des Eiereiweißes.

Auch die Wirkung von Biokatalisatoren auf das Sperma und auf den Befruch-

tungserfolg nach deren Zusatz zum verdünnten Samen wurde studiert. Am naheliegendsten war die Prüfung des Fermentes Hyaluronidase. Die Erkenntnis, daß Hyaluronidase den Zwischenzellkitt der das befruchtungsfähige Ei umgebenden Corona radiata auflösen vermag, um das Eindringen der Spermien zu ermöglichen (A u s t i n (8)), und daß eine Beziehung zwischen Hyaluronidasegehalt und Spermienanzahl im Ejakulat besteht (C a l i s t i (15)), veranlaßte F i o r e n t i n o und C a r e t t a (23) 459 Kühe mit Sperma zu besamen, dem kristallisierte Hyaluronidase zugesetzt war. Sie konnten eine Steigerung der Fruchtbarkeit von durchschnittlich 4,2 % erzielen, waren sich jedoch darüber nicht klar, ob die Fruchtbarkeitszunahme dem Zusatz von Hyaluronidase allein zuzuschreiben war. Jedenfalls war kein schädlicher Einfluß durch den Zusatz wahrzunehmen. K a e m m e r e r und N e u m a n n (43) behaupteten auf Grund ihrer Versuche, daß die Hyaluronidase durch ihre mucinspaltende Wirkung wohl nicht nur bei der Durchdringung der Spermatozoen durch die Corona radiata bis zum Ei zur Geltung kommt, sondern auch in der Lage ist, aus dem Cervikalschleim Energiestoffe für die Spermatozoen freizumachen.

Auch F r i t s c h (27) erhielt entsprechende Ergebnisse. Er prüfte die Wirkung des Hyaluronidasezusatzes in Form von Fabrikpräparaten (Kinetin, Apertase) im Gewichtsverhältnis 1:500 - 1:128.000 zu Dilothen und zum Eidotterspermasol. Die Bewegungsaktivität und Lebensfähigkeit wurde in allen Fällen günstig beeinflusst ausser bei Eidotterspermasol-Präparaten, mit denen hyaluronidasereiche Ejakulate verdünnt wurden. Nur bei Hyaluronidasezusatzerhöhungen von 1,2% gegenüber dem ursprünglichen Gehalt seien noch brauchbare Werte zu erhalten.

Von der schon seit längerer Zeit bekannten Tatsache ausgehend, daß das Vitamin C besonders in Gegenwart von H_2O_2 oder Kupfersalzen die Viskosität von Lösungen makromolekularer Stoffe, wie Stärke, Pektine und auch Hyaluronsäure herabzusetzen vermag, wiesen R ö d e l und K a r g (62) durch Literaturstudien und eigene Versuche nach, daß die im Eileiter vorhandene Ascorbinsäure und das von den Spermien gebildete H_2O_2 entsprechende Eigenschaften wie die Hyaluronidase besitzen und daß diesen Stoffen für die Ablösung der Corona radiata der Eizelle bei der Befruchtung eine Bedeutung zukommen könnte.

J ü r g e n s (42) stellte fest, daß auch Sperma Ascorbinsäure enthält. Der Ascorbinsäuregehalt ist im Nebenhodensperma am höchsten, am niedrig-

sten im Ejakulat; er ist individuellen Schwankungen unterworfen und soll kein sicherer Fruchtbarkeitsnachweis sein. Ein Zusammenhang zwischen Spermienzahl und Ascorbinsäuregehalt im Ejakulat war nicht sicher nachzuweisen.

S c h w a r z (69) und W i n t e r (85) berichten über Versuche mit Ascorbinsäurezusätzen zum verdünnten Sperma. Eine Lebensverlängerung durch Cebionzusatz (= Natriumsalz der l-Ascorbinsäure) wird erst bei Verdünnungen über 1:8 erreicht. Ascorbinsäure (Cantanlösung) zum Verdünnern zugesetzt, ist zur Erhaltung des Spermas nicht sehr vorteilhaft.

A s l a n j a n (7) bringt die Befruchtungsfähigkeit ebenfalls in Beziehung zur Beschaffenheit des Scheidenschleimes und erklärt, daß ein dünnflüssiger Zustand desselben die Befruchtung begünstige, ein dichter, sulzartiger sie erschwere. Durch Zugabe von Mucinase, eines mucinspal tenden Fermentes, zum Verdünnern, soll eine für die Befruchtung ungünstige Beschaffenheit des Scheidenschleimes kompensiert und damit das Ergebnis der künstlichen Besamung bedeutend verbessert werden. Die Eimembran soll dabei nicht depolymerisiert werden. (S o k o l o w s k a j a (71)). S o k o l o w s k a j a (72) konnte nach Zusatz von Mucinase zu einem Verdünnern, bestehend aus Glykokoll oder Glukose und Natriumcitrat, den Befruchtungsdurchschnitt um 17% (!) erhöhen. Die Wirkung soll auch auf Erhöhung des Redoxpotentials und auf direkter Beeinflussung der Spermien beruhen, der Mucinasegehalt des Verdünners beeinträchtigt die Haltbarkeit des Samens im gebrauchsfertigen Gemenge innerhalb von zwei Tagen nicht.

Anhand des Schrifttums zeigt sich, daß besonders zwei Fragen weiterer Prüfung wert sind:

- 1) Ist ein Samenverdünnungsmedium auf der Basis von Trockenmilchpulver in der Lage, im Vergleich zu den bisher verwendeten Verdünnern auf Eidottercitratbasis gleichwertige in-vitro-Ergebnisse zu liefern?
- 2) Wird durch einen Zusatz von Glykokoll zu Verdünnern auf der Basis von Trockenmilchpulver und Eidottercitrat die Lebensdauer der Spermien verlängert und damit entsprechend ihre Bewegungsaktivität erhöht?

Zur Klärung dieser Fragen bediente ich mich der vergleichenden mikroskopischen Untersuchung und der manometrischen Methode zur Bestimmung des

Sauerstoffverbrauchs nach Warburg von Ejakulaten in verschiedenen Pufferungsmedien.

Material und Methodik

Für die Verdünnungsversuche wurde nur frisch gewonnenes Sperma von 15 Klinik- bzw. Besamungsbullen verwendet, die klinisch gesund erschienen und deren Alter zwischen 2 und 6 Jahren schwankte. Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden bei der Beschreibung der Versuche und bei der Diskussion die einzelnen Bullen unter grossen lateinischen Buchstaben (A-P) aufgeführt.

Zur Herstellung der Verdünnner wurden verwendet:

- 1) Trockenmilchpulver verschiedener Herstellerfirmen.
- 2) "Molico". Sprühmagermilch in Pulverform, hergestellt von der Firma "Nestle", das, wenn nicht anders angegeben, zuerst unter gleichen Teilen aqua bidest. von 50° C unter ständigem Umrühren zu einem Brei verrührt und anschließend durch weiteres Zugeben von Aqua bidest. bis zum Verhältnis 1:10 suspendiert wurde.
- 3) Spermasol N der Firma Mack, Illertissen, mit einem Zusatz von 20% frischem Eidotter.
- 4) Wärmedepolymerisierte, elektrolytfreie Gelatine der Firma Mack.
- 5) Glykokoll der Firma Mack.
- 6) Spermasol G, das nach eigenen Angaben von der Firma Mack hergestellt wurde.
- 7) Antibiotika-Schere der Firma Mack. Für je 100 ml sämtlicher hergestellten Verdünnnerflüssigkeiten wurde ein entsprechendes Quantum der Antibiotika-Schere verwendet.

Gewinnung, Verdünnung und Beurteilung des Samens.

Der Samen wurde mittels Gummivagina (Hannoversches Modell) entweder von Bullen am Phantom gewonnen oder durch Aufstellen einer Kuh oder eines Bullen als Pseudodeckpartner im stationären Sprungstand.

Sobald sich das Sperma unmittelbar nach erfolgter Ejakulation in die Gummivagina im Auffanggläschen gesammelt hat, wurde dieses mit sterilem Stanliolpapier abgedeckt und in ein Wasserbad von ca 30° C gestellt. Anschließend wurden die Ejakulate hinsichtlich Menge, Farbe und Konsistenz, Dichte und Güte untersucht; der pH-Wert mittels Indikatorpapier, die Dich-

te photometrisch oder, soweit für die Atmungsversuche erforderlich, in einer Zählkammer festgestellt. Die Güte wurde nach der Massenbewegung (M +, M ++, M +++ oder M -) und nach dem prozentuellen Anteil der vorwärts- und ortsbeweglichen und toten Spermien (V., O., T.) bestimmt.

Die jeweils vorgesehenen Verdünnungsflüssigkeiten, sowie die Samengläschen bzw. die Verdünnungsflasche wurden ebenfalls in das Wasserbad, wo sich der gewonnene Samen befand, verbracht. Bei einer Temperatur von 20-25° C wurde der Samen entweder direkt im Samengläschen langsam verdünnt oder in der Verdünnungsflasche und anschließend in Samengläschen abgefüllt. Die etikettierten Samengläschen wurden mit paraffinierten Naturkorken verschlossen oder mit sterilem Paraffinum liquidum überschichtet und dann im Kühlschrank bei 4-6° C langsam abgekühlt und aufbewahrt.

Die angesetzten Samenproben wurden in der Regel am 1., 2., 3., 4., 6., 8., 10. und 15. Tage unter einem Heitzischmikroskop hinsichtlich Vorwärts- und Ortsbewegung sowie Bewegungsintensität untersucht. Auf die regelmäßige Feststellung der äussersten Lebensdauer wurde verzichtet, da für die Praxis vor allem die prozentuelle und qualitative Vorwärtsbeweglichkeit in den ersten 10 Tagen von Bedeutung ist. Die angegebenen Werte bei der mikroskopischen Untersuchung sind von einer subjektiven Betrachtungsweise abhängig. Sie genügen jedoch für den relativen Vergleich bei verschiedenen Verdünnungsmedien.

Die Messung der Wasserstoffionenkonzentration.

Die Wasserstoffionenkonzentration der zur Verdünnung verwendeten Medien wurde mit einem Potentiometer mit Chinhydronelektrode gemessen. Bei vergleichenden Versuchen mit dem Merck'schen Indikatorpapier konnte W o l z (88) die Genauigkeit dieser Methode bestätigen.

Die manometrische Methode zur Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs.

Zur Bestimmung der integralen Stoffwechselfunktionen der Spermien, die in verschiedenen Medien verdünnt wurden, bedienten wir uns der manometrischen Methode zur Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs, wie sie W a r b u r g (83) bei Gewebsschnitt-Atmungsversuchen eingeführt hatte.

Das beim Atmungsvorgang entstehende Kohlendioxyd wird dabei in geeigneter Weise durch eine Alkalilösung absorbiert, die sich in einem gesonderten Teil des Reaktionsgefäßes befindet, so daß als manometrischer Effekt der Verbrauch des Sauerstoffs gemessen werden kann. Da die Volumina des Reaktionsgefäßes und des eingebrachten Inkubationsmediums gegeben sind, kann aus der Druckänderung die Menge des verbrauchten Sauerstoffes errechnet werden.

Bei dieser Messung handelt es sich um die Bestimmung der Geschwindigkeit einer heterogenen chemischen Reaktion, die mehr oder weniger stark von der Temperatur abhängig ist. Daher werden die Bestimmungen in einem Thermostaten durchgeführt, dessen Temperatur auf $< \pm 0,5^{\circ} \text{C}$ konstant gehalten werden kann.

Da es sich bei dem vorgenannten System um eine mehrphasige Reaktion handelt (Grenzfläche: gasförmig-flüssig bzw. flüssig-fest), muß dafür Sorge getragen werden, daß der Sauerstoff mit konstanter Geschwindigkeit in das verdünnte Ejakulat gelangt und das gebildete Kohlendioxyd ebenso schnell entbunden werden kann. Dies wird mit einer Schüttelvorrichtung erreicht, wobei die Reaktionsgefäße mit gleicher Amplitude und gleichmässiger Geschwindigkeit von 80 Schlägen pro Minute im Inkubationsbad bewegt werden.

Die Durchführung der Atmungsversuche.

Das zu prüfende Verdünnungsmedium wurde einem in seinen Werten bekannten Ejakulat zugesetzt. Nach vorsichtigem Einpipettieren von 0,2 ml n-NaOH-Lösung und 3 ml verdünnten Samens in die Reaktionsgefäße, wurden diese an die Manometer befestigt und in das auf die Temperatur von $38,0^{\circ} \text{C}$ eingestellte Inkubationsbad verbracht. Nach dem Temperatúrausgleich von 15 Minuten Dauer bei freiem Sauerstoffzutritt wurde mit der manometrischen Messung begonnen, indem die Abnahme des Sauerstoffdruckes alle 15 Minuten über einen Zeitraum von 2 Stunden am Manometer abgelesen wurde.

Da trotz der Thermoregulation kleinere Luftdruckschwankungen auftreten können, die sich auf die manometrischen Ablesungen auswirken, liefen stets zwei Kontrollmanometer mit, die keinen verdünnten Samen enthielten, sondern nur 0,2 ml NaOH. Dadurch war es möglich, zu jedem Zeitpunkt manometrische Schwankungen, die durch Temperaturdifferenzen des Thermostaten

oder durch evtl. Luftdruckschwankungen hervorgerufen waren, in Korrektur zu stellen. Es werden nach dieser Methode folgende Grössen gemessen:

- 1) Die Zeit
- 2) Die Abnahme des Sauerstoffdruckes P
- 3) Die Druckänderung am Nullmanometer P

Die gemessenen Sauerstoffdruckabnahmen $\overset{0}{\text{stellen}}$ noch kein hinreichendes Maß für eine vergleichende Betrachtung dar. Sie sind abhängig:

- 1) vom freien Gasvolumen der Reaktionsgefässe,
- 2) von der Gesamtzahl der atmenden Samenzellen im Reaktionsgefäß,
- 3) von der Versuchstemperatur.

Die Faktoren zu 1) und 3) werden erfaßt durch die Bestimmung des Volumens des Reaktionsgefässes, sowie durch die Reduktion auf die normalen Bedingungen ($T = 273 + 38^{\circ} \text{C}$, $P = 760 \text{ Torr.}$), vermittels des idealen Gasgesetzes, dessen Anwendbarkeit hier vorausgesetzt werden kann.

Die Endformel der Reduktion auf das verbrauchte Sauerstoffvolumen unter Normalbedingungen, wie sie aus Rechenoperationen von D i x o n (17), U m b r e i t (80) und B e r g m e y e r (10) hervorgegangen ist, lautet:

$$X_{\text{o}_2} = P_{\text{korr}} \cdot \frac{V_G \frac{273}{T} - V_F \cdot \alpha}{P_{\text{norm}}}$$

X_{o} = verbrauchte Sauerstoffmenge in mm^3

P_{korr} = die Manometerablesung des um die Schwankung der Kontrollmanometer korrigierten Sauerstoffdruckes in mm Brodielösung

V_G = Volumen eines Reaktionsgefässes abzüglich der eingebrachten Flüssigkeitsmengen

T = die absolute Temperatur beim Atmungsvorgang, in diesem Falle $273 + 38 = 311$

P_{norm} = Normaldruck ausgedrückt in 10.000 mm Brodielösung

$V_F \cdot \alpha$ = Volumen der Flüssigkeit x Bunsen'scher Absorptionskoeffizient.

Der Faktor $V_F \cdot \alpha$ wurde bei allen Berechnungen nicht berücksichtigt, weil der entsprechende Wert sehr klein und für das Ergebnis ohne Bedeutung ist.

Der Faktor zu 2) wird im wesentlichen durch die Anzahl der lebenden Spermien im Reaktionsgefäß gegeben, da wir angenommen haben, daß alle Spermien vom Sauerstoff getroffen werden. Demnach müßten also bei der Auswertung der Versuche die als sicher tot geltenden Samenzellen eliminiert werden. Da uns jedoch alle Untersuchungsmethoden zur Feststellung der toten Spermien wegen der hohen Fehlergrenzen ungeeignet erschienen, sahen wir uns gezwungen von der Berücksichtigung der toten, nicht atmenden Spermien abzusehen und die Gesamtdichte als Ausgangsbasis zu nehmen. Diese Rechenoperationen scheinen insofern gerechtfertigt, als kein Wert auf den Vergleich von Ejakulaten verschiedener Bullen gelegt wird, sondern vielmehr der relative Einfluß verschiedener Verdünnungsmedien demonstriert werden soll.

Da wir jedoch mit verschiedenen Verdünnungsgraden arbeiteten, wurden sämtliche errechneten Werte auf den Sauerstoffverbrauch von 10^9 Spermien bezogen, um somit eine geeignete Vergleichsbasis zu schaffen.

Die Berechnung des Sauerstoffverbrauchs von 10^9 Spermien wird durch folgende Formel bestimmt:

$$E = \frac{X_o \times 10^9}{S}$$

E = Sauerstoffverbrauch von 10^9 Spermien in mm^3

X_o = verbrauchte Sauerstoffmenge in mm^3

S = Gesamtzahl der in einem Reaktionsgefäß befindlichen Spermien.

Untersucht man nun bei zwei gleichen Ejakulaten den Einfluß zweier Verdünnungsmedien zu einem bestimmten Zeitpunkt, so kann dieser Einfluß in Prozenten des Sauerstoffverbrauchs des einen oder anderen Verdünners ausgedrückt werden.

$$\text{z.B. : } y = \frac{\text{Sauerstoffverbrauch des Versuchsverdünners} \times 100}{\text{Sauerstoffverbrauch des Kontrollverdünners}}$$

Der Sauerstoffmehrverbrauch des Versuchsverdünners beträgt demnach $y - 100 = \bar{U}$ (Überlegenheit).

Beschreibung der Versuche.

Teil A

Mikroskopische Untersuchung von Ejakulaten in verschiedenen Verdünnungsmedien.

Versuchsgruppe I (Versuche 1-12)

Versuche 1-3

In den nachstehenden Versuchen wurde festgestellt, welche von den geprüften resuspendierten Trockenmilchprodukten sich für die Verdünnung des Spermas am geeignetsten erweisen. Verwendet wurden hierzu:

Walzenvollmilchpulver

Walzenmagermilchpulver

Sprühvollmilchpulver

Sprühmagermilchpulver

verschiedener Herstellerfirmen.

Die Trockenmilchsubstanzen wurden mit aqua bidest. im Verhältnis 1:10 resuspendiert. Ihr pH-Wert schwankte zwischen 6,35 und 6,4. Als Vergleichsverdünnung diente Eidotterspermasol.

Nach der Resuspension mußte das im Walzenverfahren hergestellte Trockenmilchpulver etwa 15 Minuten in einem Wasserbad von 90° C erhitzt und anschließend filtriert werden, um eine vollkommen homogene Lösung zu erhalten. Bei sämtlichen Trockenvollmilchlösungen wurde die mikroskopische Untersuchung durch die Anwesenheit von Fettkügelchen bedeutend erschwert.

Für die in dieser Richtung liegenden Verdünnungsversuche wurden Ejakulate von folgenden Bullen verwendet:

K: 5,5 ml, D = 1,425 Mill.; pH = 6,5; ++M, 85% V, 10% T.

K: 6,5 ml, D = 1,725 Mill.; pH = 6,4; +++M, 90% V, 5% T.

H: 4,3 ml, D = 1,250 Mill.; pH = 6,2; ++M, 85% V, 10% T.

Der mit Sprühmagermilch verdünnte Samen zeigte gegenüber Sprühvollmilch- und Walzentrockenmilchverdünnern eine geringe Überlegenheit in Beweglichkeit und Lebensdauer der Spermien. Bei allen geprüften Trockenmilchpuffern konnten die Werte von Eidotterspermasol nicht ganz erreicht werden.

Versuch 4

Durch einen weiteren Versuch konnte endgültig festgestellt werden, daß unter sämtlichen geprüften Magermilchpulversorten bezüglich Löslichkeit und Einfluß auf die Spermien sich das Sprühmagermilchpulver "Molico" der Firma Nestle als das beste erwies.

Versuch 5

Nachstehender Versuch wurde angestellt um zu ermitteln, durch welche Behandlungsmethoden der mit resuspendierter Molico verdünnte Samen Wertverbesserungen aufweist. Wir resuspendierten Molico im Verhältnis 1:8 - 1:15 mit aqua bidest.. Ein Ejakulat des Bullen I (3,5 ml, 1,275 Mill., pH = 6,3%; ++M, 90% V, 5% T.) wurde im Verhältnis 1:8 damit verdünnt. Die Samenproben, die mit im Verhältnis 1:9 - 1:12 gelöster Molico verdünnt waren, wiesen den höchsten Anteil an vorwärtsbeweglichen Spermien auf. Die Proben 1:10 zeigten die energetisch stärkste Bewegungsintensität.

Versuche 6 und 7

In zwei weiteren Versuchen wurde unter Verwendung von Ejakulaten der Bullen H (4 ml, 1,25 Mill., +++M, 90% V, 5% T) und K (6,5 ml, 1,400 Mill., +++M, 90% V, 5% T) die Frage zu klären versucht, ob durch Zentrifugieren, Filtrieren oder 24-stündiges Dialysieren der 1:10 gelösten Molico gegen 3,9%ige Natriumcitratlösung eine Veränderung der Werte des verdünnten Samens verursacht werde.

Die mit dialysierter Molicolösung verdünnten Samenproben zeigten starken Bodensatz und starke Agglutination, hatten eine schwache Motilität und kurze Lebensdauer.

Unveränderte, zentrifugierte und filtrierte Molico-Samenproben wiesen sowohl in der Beweglichkeit wie in der Lebensdauer keine signifikanten Unterschiede auf und lagen nur wenig unter den Werten von Spermasol.

Versuche 8 - 11

Aus mehreren Verdünnungsreihen mit Ejakulaten von Bullen mit verschiedenen Samendichtegraden (0,5, 0,8, 1,2 und 2,75 Mill.) war ersichtlich, daß ein Ejakulat soweit verdünnt werden kann, bis sich noch etwa 150.000, im

äussersten Falle 100.000 Spermatozoen im mm³ befinden, ohne daß die Bewegungsaktivität des Samens vermindert wird.

Versuch 12

Um festzustellen, ob die Zusammensetzung der Molico jahreszeitlichen Schwankungen unterliegt und dadurch der Samen negativ beeinflußt werden könnte, wurde ein Ejakulat des Bullen E (4 ml, 0,733 Mill., +++M, 85% V, 5% T) mit resuspendierter Molico verschiedener Herstellungsmonate verdünnt. Die verwendeten Molicopräparate wurden am 20. März, 26. Mai, 31. Juli, 10. September und 19. November 1955 hergestellt. In dem sich über einen Zeitraum von 24 Tagen erstreckenden Versuch konnten bei der mikroskopischen Untersuchung keine Unterschiede festgestellt werden. Die mit Eidotterspermasol verdünnten Kontrollen wiesen eine nur wenig längere Lebensdauer auf, die Motilität war jedoch nicht besser als bei den Molico-proben.

Versuchsgruppe II (Versuche 13-16)

Bei diesen Versuchen sollte die Frage geklärt werden, ob durch einen Gelatinezusatz zum Trockenmilchverdünner Molico eine Verbesserung der Werte erreicht werden kann. Dazu wurde elektrolytfreie Gelatine von der Firma Mack benutzt. Die Gelatine wurde in Substanz dem Trockenmilchverdünner zugesetzt und mindestens 10 Minuten in einem Wasserbad von 90°C unter ständigem Umrühren erhitzt.

Mit Molico und einem Gelatinezusatz von verschiedenen Konzentrationen wurden die Ejakulate folgender Bullen verdünnt im Verhältnis 1:8:

K (6,5 ml, 2,250 Mill.; ++M; 85% V, 10% T)

L (7,0 ml, 1,270 Mill.; ++M; 85% V, 5% T)

im Verhältnis 1:16:

E (4,0 ml, 0,733 Mill.; ++M; 85% V, 10% T)

L (5,7 ml, 1,225 Mill.; +++M; 80% V, 10% T)

Aus den Ergebnissen geht hervor, daß durch den Gelatinezusatz die Werte nicht verbessert werden konnten. Zwischen den Gelatinekonzentrationen von 0,1 - 0,8% traten aber auch keine Verschlechterungen der Werte ein. Bei Konzentrationen über 1,5 % war schon am Tage der Verdünnung ein zunehmender Abfall der Werte festzustellen.

Obwohl die Gelatine Eiweißbausteine enthält, die sich am Stoffwechsel der Spermatozoen beteiligen können, so dient sie doch im wesentlichen als Substanz zur Erhöhung der Viskosität und damit als Vorbeugungsmittel gegen Sedimentation. Die Gefahr einer Sedimentation bei Verdünnung des Samens mit Molico ist allerdings nicht ausgeschlossen.

Versuchsgruppe III (Versuche 17 und 18)

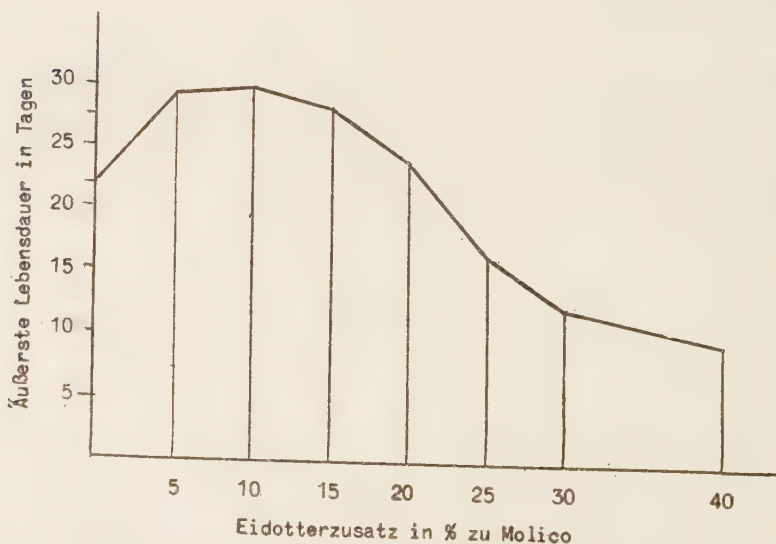
Es sollen in dieser Versuchsgruppe Eidotterspermasol, Molico und Molico mit Eidotterzusätzen von 5-40% verglichen werden.

Verdünnt wurden im Verhältnis 1:8 Ejakulate der Bullen:

B (2,5 ml, 1,24 Mill.; +M; 70% V, 15% T)

H (6,0 ml, 1,64 Mill.; +++M; 90% V, 10% T)

Die mit Eidotterspermasol und Molico verdünnten Samenproben wiesen nahezu die gleichen Werte auf. Von allen Molico-Proben mit Eidotterzusätzen zwischen 5 und 20% lagen die Werte über denen von Eidotterspermasol und Molico. Optimaler Verdünner dieser Versuchsreihe war Molico mit einem Eidotterzusatz von 10%. Sehr störend auf die mikroskopische Untersuchung wirkte sich die Inhomogenität der Lösung aus. Nachstehende Kurve zeigt den Abfall der Werte mit zunehmender Eidotterkonzentration an. Dieses Ergebnis entspricht der in der Literatur angegebenen optimalen Eidotterkonzentration beim Milchverdünner (P e t e r s (53)) und Trockenmilchverdünner (J a c q u e t und C a s s o u (40)).



Durchschnittswerte der Versuche 17 und 18

Versuchsgruppe IV (Versuche 19-27)

Zur Prüfung der Frage, ob und in welcher Weise ein Zusatz von Glykokoll zu Molico das Samenbild zu beeinflussen imstande ist, wurden 7 Versuche angestellt.

Versuch 19

Zu Molico wurden Zusätze von 1, 2, 4, 6 und 8% Glykokoll in Substanz gegeben und damit ein Ejakulat des Bullen K (6,5 ml, 1,2 Mill.; ++M, 80% V, 10% T) 1:6 verdünnt. Je höher der Zusatz an Glykokoll war, desto kürzer war die Lebensdauer des verdünnten Samens. Bei einem Glykokollzusatz von 1% war die Lebensdauer 15 Tage, bei Molico ohne Zusatz 14 Tage und bei Eidotterspermasol 18 Tage. Ein Zusatz von Glykokoll in Substanz zu Molico ist nicht zu befürworten, weil die Werte dadurch in den geprüften Konzentrationen nicht verbessert werden.

Versuche 20 - 22

In den drei nachfolgenden Versuchen wurden mit einem Puffer, bestehend aus gleichen Teilen Molico und 2-6%iger Glykokoll-Lösung, drei Ejakulate des Bullen L im Verhältnis 1:6, 1:8 und 1:10 verdünnt.

Ejakulat I : 7,0 ml, 1,270 Mill.; ++M, 80% V, 10% T

Ejakulat II : 5,7 ml, 1,225 Mill.; ++M, 75% V, 15% T

Ejakulat III : 4,0 ml, 1,080 Mill.; +++M, 80% V, 10% T

In allen Samenproben war vom 2. Tag an eine geringgradige Sedimentation zu finden. Die optimale Konzentration der Glykokoll-Lösung lag fast die ganze Versuchsdauer hindurch zwischen 5,3 und 5,6 % und sank nach durchschnittlich 30 Tagen schlagartig auf 4,9 - 5,2 % ab. Anders ausgedrückt zeigten die Samenproben mit einer Glykokollkonzentration von etwa 5,5 % bei einer Lebensdauer von 32 Tagen die stärkste Bewegungsaktivität, während die äusserste Lebensdauer bei einer Glykokollkonzentration von etwa 5,0% mit 36 Tagen optimal war. Die Lebensdauer bei Molico ohne Glykokoll betrug 20, bei Eidotterspermasol 22 Tage. Die Vergleichspräparate Molico und Eidotterspermasol wurden auch bezüglich der Bewegungsintensität getroffen.

Versuche 23 und 24

Um das günstigste Mischungsverhältnis von Molico und 5,5%iger Glykokoll-Lösung herauszufinden, wurden zwei Ejakulate des Bullen L (I: 5,2 ml, 1,22 Mill.; +++M, 85% V, 5% T. II: 5,5 ml, 1,26 Mill.; +++M; 85% V, 10% T. im Verhältnis 1:10 verdünnt.

Die Mischungsverhältnisse waren Molico: 5,5%ige Glykokoll-Lösung wie 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1 und 6:1. Mit steigendem Glykokollgehalt nahm die Sedimentation ab. Die überall vorhandene Agglutinationsneigung trat zwischen den Verhältnissen 1:2 bis 4:1 in den Hintergrund.

Nachstehende Übersicht möge die Sedimentation und Agglutinationssituation veranschaulichen:

Mischungsverhältnis von Molico zu Glykokoll

	1:5	1:4	1:3	1:2	1:1	2:1	3:1	4:1	5:1	6:1
Sedimentation	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+						
	+	+	+							
	+									
Agglutination	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+					+	+	
	+	+								+
	+									+

Aus dieser Übersicht kann man sich bereits ein eindrucksvolles Bild darüber machen, in welchen Grenzen die optimalen Werte bei diesen Versuchen liegen.

Das optimale Mischungsverhältnis zwischen Molico und 5,5%iger Glykokoll-Lösung war 3:1 bei Versuch 23 und 4:1 bei Versuch 24 über einen Zeitraum von 12 bzw. 15 Tagen, um sich dann schließlich rasch auf 1:2 bzw. 1:1 einzustellen. Die Werte der Vergleichspräparate Molico und Eidotterspermasol wurden in den ersten 12 - 15 Tagen stets übertroffen.

Versuche 25 - 27

In drei weiteren Versuchen wurden mit zwei Verdünnern, nämlich Eidotterspermasol und Molico-Glykokoll (3:1), drei Ejakulate der Bullen A, F und

im Verhältnis 1:10, 1:20 und 1:30 verdünnt.

8,0 ml, 1,2 Mill.; +++M, 90% V, 5% T

6,0 ml, 0,7 Mill.; +++M, 85% V, 5% T

3,2 ml, 0,4 Mill.; ++M, 75% V, 10% T

Nachstehende Tabelle gibt über den prozentuellen Anteil der vorwärtsbeweglichen Spermatozoen in den einzelnen Verdünnungen Aufschluß:

Tabelle I

	nach Stunden	0	24	48	72	120	168	216	336
	Verdünnungs-								
	grad								
Eidotter-	1 : 10	77	75	68	57	47	36	22	7
Spermasol	1 : 20	75	67	58	47	33	25	13	2
	1 : 30	72	62	51	33	20	8	2	0
Molico-	1 : 10	73	67	62	58	50	40	26	13
Glykokoll	1: 20	73	66	60	57	48	37	25	12
(3:1)	1 : 30	70	65	60	50	47	35	24	11

Wie aus der Tabelle zu entnehmen ist, sind die Unterschiede zwischen den einzelnen Verdünnungen bei den Molico-Glykokoll-Proben viel geringer als bei den Eidotterspermasolproben (Vergl. S c h m i d t und J e n i c h e n (68)). Während bei der Verdünnung 1:10 nur in den ersten 72 Stunden Eidotterspermasol dem Molico-Glykokollverdünner überlegen ist und bei den Verdünnungen 1:20 und 1:30 nur in den ersten 24 Stunden, wird beim Molico-Glykokollverdünner sowohl in Richtung der höheren Verdünnungen wie auch mit zunehmendem Alter des verdünnten Samens die Bewegungsaktivität der einzelnen Spermien längere Zeit beibehalten. Bei steigendem Verdünnungsgrad zeigten die Molico-Glykokollproben eine zunehmende Sedimentationsneigung und ein vermehrtes Auftreten von eigenartigen Agglutinationsercheinungen, bei denen sich bisweilen 2, manchmal aber auch 3 oder gar 4 Spermien mit ihren Köpfen zusammenlegten ohne ihre Beweglichkeit einzubüßen.

Versuchsgruppe V (Versuche 28-44)

Versuche 28-30

In dieser Versuchsreihe wird durch Zugabe von wärmedepolymerisierter Gelatine der Firma Mack zu Molico-Glykokoll (3:1) eine Viskositätssteigerung angestrebt. Dadurch soll die Sedimentbildung verhindert werden. Das Molico-Glykokoll-Gelatine-System wird in verschiedenen Verdünnungsgraden mit Eidotterspermasol bzw. Molico ohne Zusätze verglichen.

Drei Ejakulate der Bullen:

E: 5,6 ml, 0,976 Mill.; +++M, 80% V, 10% T

L: 5,5 ml, 1,260 Mill.; +++M, 85% V, 10% T

L: 3,5 ml, 0,977 Mill.; ++M, 75% V, 15% T

wurden mit Molico-Glykokoll (3:1) und Gelatinezusätzen von 0,1 - 1,0% im Verhältnis 1:10 verdünnt.

Die optimale Viskosität lag bei einem Gelatinezusatz von 0,4 - 0,5%. Die Sedimentation trat bei den Samenproben mit einem Mindestgelatinegehalt von 0,2 % nicht mehr auf. Bei Zusätzen zwischen 0,3 - 0,6% Gelatine waren die Bewegungsaktivität und Lebensdauer gegenüber den übrigen Samenproben nur geringgradig erhöht. Ein Gelatinezusatz zu Molico-Glykokoll erscheint daher schon allein wegen des sedimentverhindernden Effektes in einer optimalen Konzentration von 0,4 - 0,5 % vertretbar. Das Agglutinationsphänomen, bei dem sich zwei bis drei Spermienköpfe zusammenlegen, ohne ihre Beweglichkeit zu verlieren, trat nicht so stark auf, wie bei Molico-Glykokoll ohne Gelatinezusatz.

Versuche 31 - 33

In den folgenden drei Versuchen wird das Milchverdünnersystem, bestehend aus drei Teilen Molico, einem Teil 5,5%iger Glykokoll-Lösung und einem Zusatz von 0,5% Gelatine, mit Eidotterspermasol verglichen. Mit beiden Flüssigkeiten wurden die Ejakulate der Bullen:

O: 12,0 ml, 1,0 Mill.; ++M, 80% V, 15% T

F: 6,0 ml, 0,7 Mill.; +++M, 90% V, 5% T

P: 3,0 ml, 0,4 Mill.; ++M, 70% V, 10% T

im Verhältnis 1:10, 1:20 und 1:30 verdünnt.

In nachstehender Tabelle sind die drei Versuche (31-33) zusammengefaßt. Es werden darin die Anteile der vorwärtsbeweglichen Spermatozoen in den einzelnen Samenproben verglichen.

Tabelle 2

Verdüner	Eidotterspermasol			Molico-Glykokoll-Gelatine-System		
	1:10	1:20	1:30	1:10	1:20	1:30
Verdünnungsgrad						
nach 0 Stunden	75	74	72	70	70	68
" 24 "	72	68	65	65	65	64
" 48 "	65	57	52	61	60	60
" 72 "	55	45	31	60	58	55
" 120 "	48	34	19	56	54	50
" 168 "	40	26	9	45	42	38
" 216 "	31	18	3	36	32	26
" 336 "	7	0	0	15	11	8

Auch hier zeigt sich wieder, ähnlich wie in Tabelle 1, daß beim Verdünnungsgrad 1:10 nur während der ersten 48 Stunden und bei den Verdünnungsgraden 1:20 und 1:30 nur während der ersten 24 Stunden Eidotterspermasol dem Milchglykokoll-Verdüner überlegen ist. Der Wertabfall in den einzelnen Verdünnungsgraden vollzieht sich beim Milch-Glykokoll-Puffer nicht so rasch wie bei Eidotterspermasol. Sedimentbildung beim Molico-Glykokoll-System trat dank des 0,5%igen Gelatinezusatzes nicht in Erscheinung.

Versuche 34 - 44

In den folgenden Versuchen wurden zehn Ejakulate von 4 verschiedenen Bullen mit Molico bzw. Molico-Glykokoll-Gelatine im Verhältnis 1:6, 1:12 und 1:18 verdünnt. Verwendet wurden die Ejakulate der Bullen:

P: 4,8 ml, 0,544 Mill.; +M, 80% V, 15% T
 E: 4,7 ml, 0,444 Mill.; +M, 80% V, 15% T
 P: 7,5 ml, 0,322 Mill.; +M, 85% V, 10% T
 E: 3,8 ml, 0,520 Mill.; ++M, 80% V, 10% T
 M: 8,0 ml, 1,250 Mill.; +++M, 75% V, 20% T
 D: 3,0 ml, 1,633 Mill.; +++M, 80% V, 10% T
 P: 3,0 ml, 0,688 Mill.; ++M, 75% V, 20% T

E: 9,0 ml, 0,948 Mill.; +++M, 80% V, 10% T
M: 6,4 ml, 1,125 Mill.; +++M, 80% V, 15% T
D: 6,6 ml, 1,285 Mill.; +++M, 75% V, 15% T

In nachstehender Tabelle sind die Anteile der vorwärtsbeweglichen Spermien der einzelnen Samenproben aller zehn Ejakulate zusammengefaßt.

Tabelle 3

Verdünnern	Molico			Molico-Glykokoll- Gelatine-System		
	1:6	1:12	1:18	1:6	1:12	1:18
Verdünnungsgrad						
nach 0 Stunden	68,6	67,5	66,2	68,8	70,0	70,0
" 24 "	66,2	67,1	66,7	70,5	72,7	71,3
" 48 "	62,5	65,0	64,2	70,0	71,4	70,9
" 72 "	60,0	61,4	61,0	68,0	68,8	68,6
" 120 "	58,6	61,2	59,8	65,2	66,4	66,1
" 168 "	47,8	48,8	48,6	61,0	63,8	63,6
" 216 "	37,1	33,8	32,4	51,2	48,9	47,8
" 336 "	14,7	12,7	11,6	28,8	27,5	26,2

Sämtliche Samenproben, die mit dem glykokollhaltigen Milchverdünner gepuffert waren, zeigten in allen Verdünnungsgraden größere Bewegungsaktivität; nach 120 Stunden waren sie den Molico-Proben besonders überlegen. Individualspezifische oder ejakulatspezifische Wirkungen von Molico-Glykokoll traten nur wenig in Erscheinung. Die Unterschiede in den einzelnen Verdünnungsgraden waren gering. Während der ersten Woche war die Vorwärtsbewegung in den Verdünnungen 1:12 und 1:18 geringgradig besser als bei 1:6. Bei den Molico-Glykokoll verdünnten Proben stiegen die Werte am 2. und 3. Tag leicht an, was auf einen anfänglichen Verdünnungsschock zurückzuführen sein dürfte.

Versuchsgruppe VI (Versuche 45-52)

Die Tatsache, daß ein Zusatz von Glykokoll-Lösung das Trockenmilchpulver "Molico" als Samenverdünner erheblich verbessert, wie aus den vorherigen Versuchen deutlich zu ersehen ist, ließ den Gedanken aufkommen, daß evtl. ein solcher Zusatz sich auch auf Spermasol günstig auswirken könne.

Versuch 45

Im folgenden Versuch wurde ein Ejakulat des Bullen K (6,5 ml, 1,2 Mill.; +++M, 85% V, 5%T) mit Eigelb-Spermasol mit verschiedenen Zusätzen von Glykokoll in Substanz im Verhältnis 1:6 verdünnt. Das Ergebnis war ähnlich dem des Versuchs 19. Zusätze von über 1,4% Glykokoll störten die isotonischen Verhältnisse des Verdünners. Zusätze von 0,4 - 1,0% Glykokoll brachten keine signifikante Verbesserung von Bewegungsaktivität und Lebensdauer.

Versuche 46-48

Zu diesen Versuchen wurden drei Ejakulate der Bullen

L: (4,0 ml, 1,01 Mill.; +M, 60% V, 25% T)
E: (5,6 ml, 0,97 Mill.; +++M, 80% V, 10% T)
I: (2,0 ml, 0,85 Mill.; ++M, 70% V, 15% T)

im Verhältnis 1:6, 1:8 und 1:10 mit gleichen Teilen Spermasol ohne Gelatinegehalt und verschiedenprozentigen Glykokoll-Lösungen (4,5 - 6,0%ig) und einem Zusatz von 20% frischem Eigelb verdünnt.

Nach 24 Stunden war eine starke Sedimentbildung aufgetreten, die durch vorsichtiges Umschütteln für kurze Zeit rückgängig gemacht werden konnte. Ähnlich den Versuchen 20 -22 war auch hier die optimale Bewegungsaktivität und -intensität mit einem Anteil einer 5,4%igen Glykokoll-Lösung bei einer Lebensdauer von durchschnittlich 26 Tagen. Die optimale Lebensdauer von 32 Tagen wurde beim Anteil einer 5,0%igen Glykokoll-Lösung erreicht. Beim Vergleichsverdünner Eidotterspermasol N betrug die äußerste Lebensdauer nur 22 Tage.

Versuche 49-52

Zur Klärung der Frage, welches Mischungsverhältnis von Spermasol ohne Gelatine und 0,5%iger Glykokoll-Lösung einen optimalen Effekt bewirkt,

verdünnten wir drei Ejakulate des Bullen L im Verhältnis 1:5, 1:10 und 1:15 und ein Ejakulat des Bullen G im Verhältnis 1:12.

L₁: 5,5 ml, 1,26 Mill.; +++M, 85% V, 10% T

L₂: 3,0 ml, 0,62 Mill.; +++M, 75% V, 10% T

L₃: 3,0 ml, 0,62 Mill.; ++M, 85% V, 5% T

G: 6,0 ml, 1,20 Mill.; +M, 70% V, 20% T

Längste und optimale Bewegungsaktivität, sowie längste Lebensdauer wurde bei denjenigen Samenproben erzielt, die einen 20 - 40%igen Anteil der 5%igen Glykokoll-Lösung am Gesamtverdünner ohne Eidotterzusatz aufwiesen.

Wie aus den Versuchen 46-52 hervorgeht, verbessert bei Spermasol ein Zusatz von Glykokoll die Beweglichkeit und Lebensdauer des damit verdünnten Spermas wesentlich.

Daher wurde die Firma Mack, Illertissen, gebeten, ein Präparat herzustellen, das aus sieben Teilen Spermasolgrundflüssigkeit (d.h. Spermasol N ohne Gelatine) drei Teilen einer 5%igen Glykokoll-Lösung und einem Gelatinezusatz von 0,8% besteht. Diese Kombination erhielt den Namen "Spermasol G" und wurde in Trockenform für die weiteren Verdünnungsversuche angewendet.

Die Trockensubstanz des Spermasol G setzt sich somit aus 1,86% Spermasolgrundsubstanz, 1,5% Glykokoll und 0,8% wärmedepolomerisierter Gelatine zusammen.

Die Auflösung dieser Substanz Spermasol G wird in derselben Weise vollzogen wie bei der bisherigen Trockenform von Spermasol N.

Versuchsgruppe VII (Versuche 53-64)

In dieser Versuchsgruppe wurde die Spermiovorwärtsbewegung von 12 Ejakulaten sieben verschiedener Stiere bestimmt. Die einzelnen Ejakulate wurden in zwei gleiche Fraktionen aufgeteilt und sowohl mit Spermasol N wie mit Spermasol G, das die Glykokollkomponente enthält, im Verhältnis 1:10, 1:20 und 1:30 verdünnt.

Für diese Versuche wurden Ejakulate von folgenden Bullen verwendet:

A: 8 ml, 1,2 Mill.; +++M, 95% V, 5% T
 F: 6 ml, 0,7 Mill.; +++M, 90% V, 5% T
 G: 6 ml, 1,2 Mill.; +M, 70% V, 20% T
 C: 8 ml, 0,7 Mill.; +M, 75% V, 20% T
 M: 5 ml, 1,6 Mill.; +++M, 60% V, 20% T
 P: 4 ml, 1,0 Mill.; +++M, 80% V, 10% T
 E: 9 ml, 1,2 Mill.; ++M, 70% V, 20% T
 M: 5 ml, 1,4 Mill.; +++M, 70% V, 20% T
 P: 3 ml, 0,8 Mill.; +++M, 75% V, 15% T
 E: 4 ml, 0,6 Mill.; +M, 75% V, 15% T
 M: 8 ml, 1,3 Mill.; +++M, 85% V, 5% T
 M: 9 ml, 1,0 Mill.; ++M, 65% V, 30% T

In nachstehender Tabelle ist die durchschnittliche Spermiovorwärtsbewegung der Versuche 53 - 64 über einen Zeitraum von 336 Stunden, d.s. 14 Tage, zusammengefaßt.

Tabelle 4

Verdüner	Spermasol N			Spermasol G		
	1:10	1:20	1:30	1:10	1:20	1:30
Verdünnungsgrad						
nach 0 Stunden	72	68	61	78	73	71
" 24 "	70	63	55	74	72	70
" 48 "	65	57	45	70	68	66
" 72 "	55	47	35	63	59	53
" 120 "	36	29	18	50	46	42
" 168 "	23	13	6	39	29	24
" 216 "	11	6	1	26	22	16
" 336 "	4	1	0	17	13	8

Die Beobachtung begann zur Zeit 0, d.h. unmittelbar nach der Verdünnung des Spermas mit dem jeweiligen Verdüner.

G ö t z e (30) hat den Begriff der "äussersten Befruchtungsfähigkeit" eingeführt, der besagt, daß in einem Ejakulat noch mindestens 50% vorwärtsbewegliche Spermien enthalten sein müssen. Unter Verwendung dieses Begriffes ist aus der Tabelle 4 zu ersehen, daß diese äusserste Befruchtungsfähigkeit bei den mit Spermasol G verdünnten Samenproben 48 Stunden beim Verdünnungsgrad 1:10, 24 Stunden beim Verdünnungsgrad 1:20 und beim Verdünnungsgrad 1:30 48 Stunden länger erhalten bleibt, als bei den entsprechenden Spermasol N-Verdünnungen. Der Abfall in der Bewegungsaktivität erscheint geringer bei mit Spermasol G verdünnten Samen. In den ersten 96 Stunden waren die Unterschiede zwischen den einzelnen Verdünnungsgraden bei Spermasol G geringer als bei denen von Spermasol N.

Abbildung 2 zeigt die Kurven der aus der Tabelle 4 entnommenen Durchschnittswerte der Vorwärtsbewegung in den einzelnen Verdünnungsgraden, bei Spermasol N und Spermasol G.

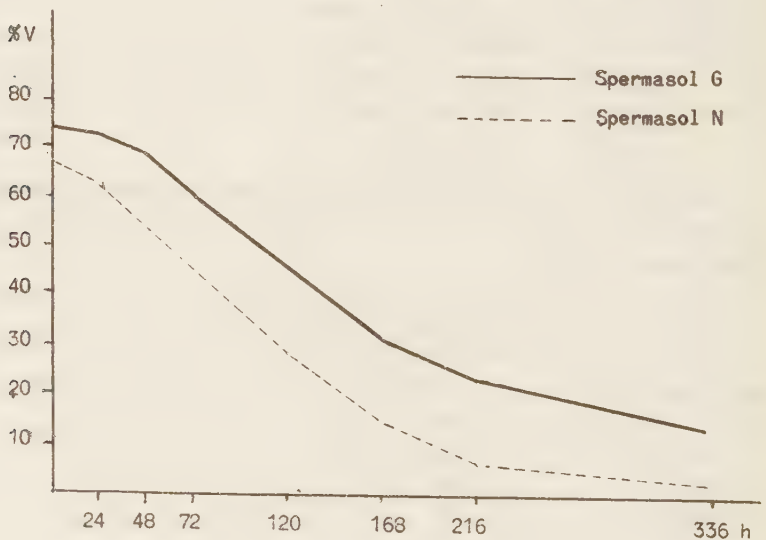


Abb. 2

Wie aus Abbildung 2 hervorgeht, ist bei Spermasol G gegenüber Spermasol N der Abfall besonders in den ersten 48 Stunden geringer.

Versuchsgruppe VIII (Versuche 65-73)

In der Versuchsgruppe VIII wurden Eidotterspermasol G, Eidotterspermasol und ein Verdünner, bestehend aus drei Teilen resuspendiertem Trockenmilchpulver Molico, einem Teil 5,5%iger Glykokoll-Lösung und einem Zusatz von 0,5% wärmedepolymerisierter Gelatine, in den Verdünnungsgraden 1:6, 1:12 und 1:18 miteinander verglichen.

Verwendet wurden von drei verschiedenen Bullen je drei Ejakulate, die an drei verschiedenen Tagen gewonnen wurden. Die drei Ejakulate wurden jeweils in drei gleiche Fraktionen aufgeteilt, diese dann mit den drei zu prüfenden Verdünnungsflüssigkeiten im Verhältnis 1:6, 1:12 und 1:18 verdünnt.

Bewertung der Ejakulate:

M:	7,0 ml, 1,866 Mill.;	+++M, 80% V, 15% T
M:	6,5 ml, 0,732 Mill.;	++M, 75% V, 20% T
M:	7,0 ml, 1,288 Mill.;	+++M, 80% V, 15% T
E:	5,0 ml, 0,855 Mill.;	+++M, 85% V, 5% T
E:	3,0 ml, 0,780 Mill.;	++M, 80% V, 15% T
E:	3,5 ml, 0,488 Mill.;	+M, 85% V, 10% T
P:	3,5 ml, 0,633 Mill.;	++M, 80% V, 10% T
P:	3,5 ml, 0,888 Mill.;	++M, 75% V, 20% T
P:	5,0 ml, 0,545 Mill.;	++M, 85% V, 10% T

Bei dieser Versuchsreihe wurden die einzelnen Samenproben nicht unter Luftabschluß, sonst aber unter den üblichen Bedingungen aufbewahrt.

Bei der Auswertung der Versuche ergab sich, daß die Ejakulate des Bullen M gegenüber denen der anderen Bullen bei sämtlichen Verdünnern, besonders jedoch bei Spermasol G, eine grössere Agglutinationsneigung zeigten. Auch beim Vergleich der einzelnen Verdünnungsflüssigkeiten war die Agglutinationsneigung bei Spermasol G geringgradig stärker, vornehmlich bei den höheren Verdünnungsgraden. Es zeigte sich ferner, daß der Milch-Glykokoll-Verdünner auf die Ejakulate des Bullen E einen besonders günstigen Einfluß ausübte.

Die Unterschiede zwischen den einzelnen Verdünnungsflüssigkeiten und Verdünnungsgraden ergeben sich aus Tabelle 5, in welcher die Durchschnittswerte aller neun Ejakulate bezüglich der vorwärtsbeweglichen Spermatozoen in % dargestellt sind.

Tabelle 5

Verdünnungs- flüssigkeit	Spermasol G			Spermasol N			Molico-Glykokoll- Gelatine		
Verdünnungs- grad	1:6	1:12	1:18	1:6	1:12	1:18	1:6	1:12	1:18
nach 0 Std.	77	76	73	74	71	67	68	67	65
" 24 "	74	73	71	69	66	61	66	63	62
" 48 "	71	67	64	63	58	46	57	56	54
" 72 "	65	63	61	54	45	32	50	48	46
" 120 "	52	50	47	34	22	13	41	40	38
" 168 "	39	35	32	22	13	3	35	33	30
" 216 "	24	18	14	10	5	0	23	20	18
" 336 "	13	8	4	3	1	0	15	11	8

Bei der Betrachtung der in Prozenten angegebenen Spermienvorwärtsbewegung bei Spermasol N fällt auf, daß die Werte besonders bei höheren Verdünnungsgraden stark abfallen. Bei Spermasol G und besonders bei Molico-Glykokoll tritt dieser negative Verdünnungseffekt nicht so stark in den Vordergrund. In den ersten 72 Stunden liegen beim Verdünnungsgrad 1:6 die Werte von Molico-Glykokoll noch unter denen von Spermasol N, sind aber nach 120 Stunden bereits um 7%, und von 168 Stunden an um 13% höher als bei Spermasol N.

Teil B

Ätungsversuche.

Im bisherigen experimentellen Teil dieser Arbeit wurde mittels der mikroskopischen Untersuchungsmethode die prozentuelle Vorwärtsbeweglichkeit der Spermatozoen durch Schätzung bestimmt.

Im folgenden Teil (Teil B) wurde nun zur vergleichenden Untersuchung über den Einfluß verschiedener Verdünnungsflüssigkeiten auf die Spermien die manometrische Methode zur Messung des Sauerstoffverbrauchs nach Warburg angewandt, um die bei der mikroskopischen Untersuchung erhaltenen Ergebnisse zu erhärten. Diese Warburg'sche Meßmethode ist hinreichend objektiv, um über den Umfang der Stoffwechselvorgänge der mit verschiedenen Medien verdünnten Ejakulate eine Aussage machen zu können. Die bei dieser Methode erhaltenen Werte über den Sauerstoffverbrauch als Maß für die Befruchtungsfähigkeit heranzuziehen, ist meines Erachtens ähnlich den bei der mikroskopischen Untersuchungsmethode erhaltenen Werten mehr oder weniger spekulativ. Absolute Ergebnisse können nur anhand der Befruchtungsergebnisse ermittelt werden.

In den folgenden Versuchen wird der jeweils aus drei Manometerablesungen resultierende Sauerstoffverbrauch von 10^9 Spermien in verschiedenen Verdünnungsmedien gemessen.

Versuchsgruppe IX (Versuche 73-79)

Versuch 73

In diesem Versuch wurde der Sauerstoffverbrauch der Spermien eines Ejakulates in folgenden Medien gemessen:

Spermasol N

Spermasol G

Molico-Glykokoll-Lösung 3:1 (+ 0,5% Gelatine)

Molico-Glykokoll-Lösung 1:1 (+ 0,5% Gelatine).

Ein Ejakulat des Bullen E (7,5 ml, 1,288 Mill.; +++M, 80% V, 10% T) wurde in vier Fraktionen aufgeteilt und mit den vier verschiedenen Verdünnungsflüssigkeiten jeweils im Verhältnis 1:12 verdünnt.

Am 1. und 3. Tag - also sofort nach der Verdünnung und 72 Stunden später - wurde der Sauerstoffverbrauch in den vier verschiedenen Medien gemessen.

Tabelle 6 enthält die Werte über den Sauerstoffverbrauch nach 120 Minuten Bebrütung.

Tabelle 6

Verdünnungsmedien	O_2 -Verbrauch in mm ³ von 10 ⁹ Spermien			Relativer Abfall in %	
	am 1.Tag	%	am 3.Tag	%	
Spermasol N	488	100	329	67,4	32,6
Spermasol G	695	100	494	71,1	28,9
Molico-Glykokoll 3:1	653	100	407	62,3	37,7
Molico-Glykokoll 1:1	647	100	206	31,8	68,2

Am ersten Tag zeigten die Glykokoll enthaltenden Verdünnungsmedien eine viel stärkere Atmungsintensität als Spermasol N. Bei den glykokollhaltigen Milchverdünnern und Spermasol N ist dagegen der relative Abfall der Atmungsintensität am dritten Tag größer als bei Spermasol G.

Die höchste Atmungsintensität zeigte jeweils Spermasol G. Setzt man den O_2 -Verbrauch von Spermasol N gleich 100, so ergeben sich für die anderen Medien Werte, die in Tabelle 7 zusammengefaßt sind.

Tabelle 7

Verdüner:	Spermasol G	Spermasol N	Molico-G 3:1	Molico-G 1:1
1. Tag	142,4	100,0	133,8	132,5
3. Tag	153,7	100,0	123,7	62,6

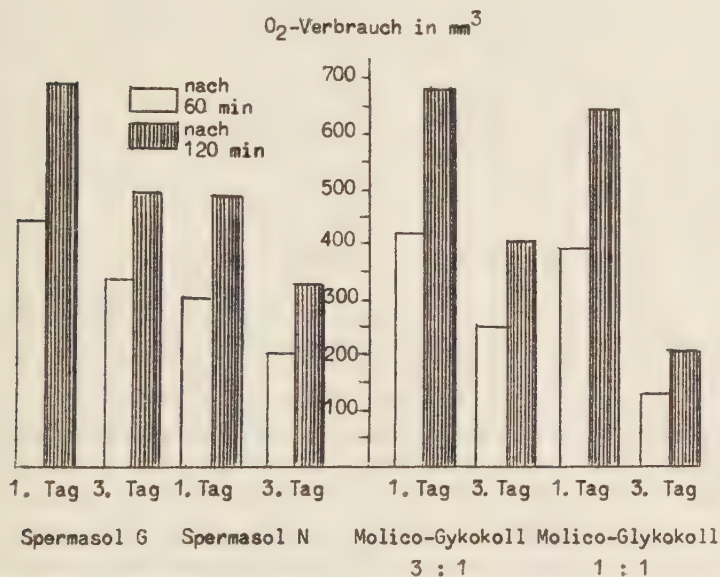


Abb. 3

Sauerstoffverbrauch von 10⁹ Spermien in verschiedenen Verdünnungsmedien am 1. und 3. Tag nach 60 und 120 Minuten Bebrütungszeit.

Versuch 74

Bei diesem Versuch wird der Sauerstoffverbrauch eines Ejakulates des Bullen E (6,0 ml, 1,544 Mill.; ++M, 80% V, 10% T; Verdünnungsgrad 1:7,2) am 1. und 3. Tag nach der Verdünnung mit Spermasol N und Spermasol G bestimmt.

In nachstehender Tabelle ist der Sauerstoffverbrauch in mm^3 vor 10^9 Spermien in den verschiedenen Verdünnungsmedien dargestellt.

Tabelle 8

Verdüner	am 1. Tag		am 3. Tag		Relativer Abfall gegenüber dem 1. Tag	
nach min.	60	120	60	120	60	120
Spermasol N	173,5	294,0	122,0	187,5	29,7	36,3
Spermasol G	246,0	410,0	144,0	232,5	41,5	43,3
Überlegenheit von Spermasol G in %	42,0	40,0	18,0	24,0		

Wie die Tabelle zeigt, sind die Stoffwechselvorgänge in den Samenzellen des Bullen E durch das glykokollhaltige Spermasol G deutlich ansprechbar.

Gegenüber dem 1. Tag ist bei Spermasol G nach 60 und 120 Minuten der relative Abfall stärker als bei Spermasol N, dessen Atmungsintensität nach 120 Minuten relativ fast genau so stark nachläßt wie bei Spermasol G. In der untersten Spalte der Tabelle 8 ist die Überlegenheit des Spermasol G, d.i. der prozentuelle Mehrverbrauch an Sauerstoff gegenüber Spermasol N, ausgedrückt. Am 3. Tag ist Spermasol G nach 60 Minuten noch um 18% und nach 120 Minuten Bebrütung noch um 24% besser als Spermasol N. Dies besagt, daß trotz des stärkeren Abfalls der Atmungsintensität von Spermasol G am dritten Tag die Stoffwechselintensität eines mit Spermasol G verdünnten Samens länger erhalten bleibt als bei Spermasol N.

Versuche 75 - 79

Bei diesen Versuchen wurde der Sauerstoffverbrauch von fünf Ejakulaten verschiedener Bullen nach Verdünnung mit Spermasol N und Spermasol G am 1., 3. und 5. Tage gemessen. Aus versuchsbedingten Gründen war es erforderlich, mit verschiedenen Verdünnungsgraden zu arbeiten.

Die Werte der verwendeten Ejakulate:

9,5 ml, 0,885 Mill.;	++M, 75% V, 20% T, Verd.Gr. 1:6,6
3,5 ml, 1,044 Mill.;	+++M, 70% V, 25% T, " " 1:20
4,5 ml, 1,188 Mill.;	+++M, 75% V, 20% T, " " 1:15
11,0 ml, 0,900 Mill.;	++M, 80% V, 10% T, " " 1:5
8,0 ml, 0,590 Mill.;	+M, 80% V, 15% T, " " 1:6,5

Tabelle 9 gibt den Sauerstoffverbrauch von 10^9 Spermien der fünf verschiedenen Ejakulate nach 60 und 120 Minuten Bebrütungszeit wieder.

Tabelle 9

Spermasol		1. Tag		3. Tag		5. Tag	
		nach 60	120	60	120	60	120 min
N	N	231,5	388,0	183,0	304,5	178,0	253,0
	G	376,5	583,0	258,5	451,0	219,5	336,0
M	N	125,5	187,0	96,5	125,5	90,0	143,0
	G	143,5	219,5	107,5	155,5	106,0	161,5
D	N	94,0	148,5	63,5	96,5	65,0	103,5
	G	100,0	171,0	93,5	148,5	91,5	140,5
E	N	179,5	255,5	174,0	259,0	124,5	186,0
	G	243,5	375,5	186,5	282,0	141,5	213,5
P	N	212,0	350,0	207,5	318,5	185,0	260,0
	G	216,5	364,0	216,0	331,0	172,0	265,0
g	N	168,5	266,0	145,0	221,0	128,5	189,0
	G	216,0	342,5	172,5	273,0	146,5	223,0
Überlegenheit von Spermasol G							
in		28,2	28,8	19,0	23,5	12,3	18,0

Bei allen fünf Ejakulaten war nach der Verdünnung mit Spermasol G stets ein höherer Sauerstoffverbrauch festzustellen. Jedoch wiesen die einzelnen Ejakulate starke Unterschiede auf, die entweder individualspezifisch,

ejakulatspezifisch oder von der Höhe des Verdünnungsgrades abhängig sein können.

Beim Vergleich der Mittelwerte der fünf Ejakulate ergibt sich, daß der relative Abfall des Sauerstoffverbrauchs am 3. bzw. 5. Tage nach der Bebrütungszeit von 120 Minuten bei Spermasol N wie bei Spermasol G nahezu gleich groß ist. Bei einer Bebrütungszeit von 60 Minuten ist jedoch der relative Abfall des Sauerstoffverbrauchs bei Spermasol G grösser, besonders am 5. Tag. Das besagt, daß während der ersten 60 Minuten die mit Spermasol N verdünnten Ejakulate relativ schneller atmen, um während der nächsten 60 Minuten in ihrer Atmungsintensität stärker abgeschwächt zu werden.

Innerhalb dieser fünf Tage fällt also der Sauerstoffverbrauch von Spermasol G im ganzen gesehen etwas stärker ab als bei Spermasol N, ist aber am 5. Tag noch höher als bei Spermasol N am 1. Tag.

Für den Vergleich der beiden Verdünnungsmedien interessiert vor allem der prozentuelle Mehrverbrauch an Sauerstoff von Spermasol G zu verschiedenen Messungszeitpunkten, wie es Abb. 4 eindrucksvoll veranschaulicht.

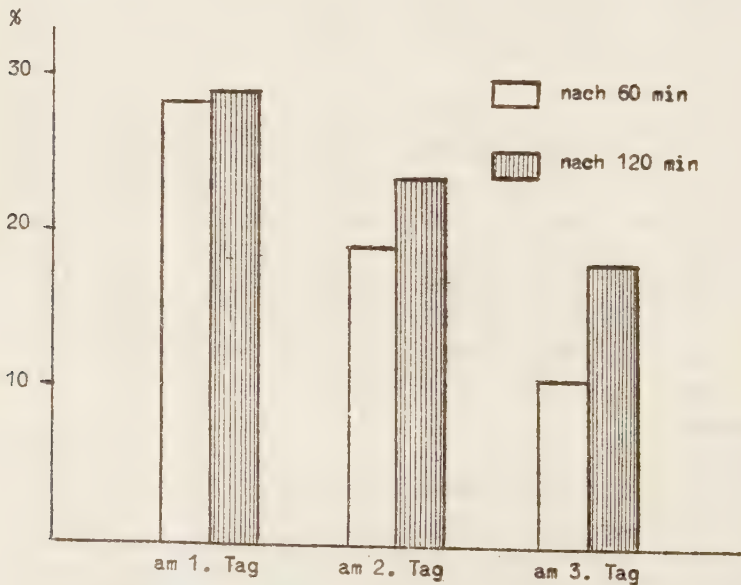


Abb. 4

Abb. 4 zeigt die prozentuelle Überlegenheit von Spermasol G nach 60 und 120 Minuten Bebrütung am 1., 3. und 5. Tag.

Am ersten Tag, d.i. am Tag der Verdünnung, sind nach der Pufferung mit Spermasol G von 10⁹ Spermien nach 60 min. 28,2% und nach 120 min. 28,8% Sauerstoff mehr verbraucht worden, als in Spermasol N. Am dritten Tag betrug der Mehrverbrauch an Sauerstoff nach 60 min. 19,2%, nach 120 Minuten 23,5% und am fünften Tag nach 60 min. 10,6% und nach 120 min. 18,0%.

Versuchsgruppe X (Versuche 80-83)

In der Versuchsgruppe IX wurde Spermasol N und Spermasol G hinsichtlich ihres Sauerstoffverbrauchs am ersten, dritten und fünften Tag verglichen. Nun soll in der Versuchsgruppe X mittels Messung des Sauerstoffverbrauchs zu klären versucht werden, ob sich bezüglich des Verdünnungsgrades Unterschiede zwischen den beiden Verdünnungsmedien ergeben.

So wurden in den Versuchen 80-83 vier Ejakulate von drei verschiedenen Bullen je drei Mal in zwei gleiche Portionen geteilt und diese jeweils mit Spermasol N und Spermasol G im Verhältnis 1:6, 1:12 und 1:18 derart verdünnt, daß letztlich von den sechs Fraktionen eines Ejakulates jeweils gleiche Mengen verdünnten Samens zur Verfügung standen. Aus versuchsbedingten Gründen war von jedem Stier eine Mindestmenge von 12 ml Samen erforderlich. Daher war es nötig, die Ejakulate von zwei oder drei Sprüngen ein und desselben Bullen zu vermischen, ehe sie verwendet werden konnten.

Die gemischten Ejakulate hatten folgende Werte:

E: 3 Spr., 15,5 ml, 0,681 Mill.; ++M, 80% V, 15% T

P: 2 Spr., 13,5 ml, 0,867 Mill.; ++M, 80% V, 10% T

E: 2 Spr., 12,0 ml, 0,855 Mill.; ++M, 75% V, 15% T

D: 3 Spr., 16,5 ml, 1,120 Mill.; ++M, 80% V, 15% T

In der Tabelle 10 ist der Sauerstoffverbrauch dieser vier Bullen-Ejakulate in den verschiedenen Medien und Verdünnungsgraden am ersten und dritten Tag nach jeweils 60 und 120 Minuten Bebrütung enthalten, ferner aus den Mittelwerten der vier Ejakulate der prozentuelle Mehrverbrauch an Sauerstoff berechnet.

Tabelle 10

Tabelle	Spermasol	Verdünn.-	am 1. Tag		am 3. Tag		
			grad	60 min	120 min	60 min	120 min
N		1: 6	215,5	323,5	203,0	299,5	
		1:12	184,0	285,0	197,5	304,5	
		1:18	252,5	366,0	246,0	323,5	
G		1: 6	243,0	364,5	230,0	343,5	
		1:12	215,5	358,0	244,5	373,5	
		1:18	297,0	433,5	298,5	392,0	
N		1: 6	174,0	284,5	189,5	285,0	
		1:12	156,0	240,0	163,5	268,5	
		1:18	148,0	249,0	202,5	277,5	
G		1: 6	225,5	373,5	213,5	326,5	
		1:12	171,0	285,0	181,0	295,0	
		1:18	203,5	318,0	235,0	301,0	
N		1: 6	136,5	200,0	110,5	165,5	
		1:12	120,5	172,0	95,0	141,5	
		1:18	163,5	219,0	163,0	212,0	
G		1: 6	148,5	228,0	136,5	203,5	
		1:12	129,5	196,0	108,0	171,5	
		1:18	191,5	241,0	184,0	257,5	
N		1: 6	93,0	143,0	88,0	142,5	
		1:12	79,5	138,0	91,5	145,0	
		1:18	113,5	163,0	125,5	177,5	
G		1: 6	101,0	158,0	98,5	160,0	
		1:12	106,0	160,0	93,0	149,0	
		1:18	135,5	198,0	132,0	198,0	
N		1: 6	155,0	238,0	148,0	223,0	
		1:12	135,5	209,0	136,5	215,0	
		1:18	169,5	249,5	184,0	248,0	
G		1: 6	179,5	256,0	169,5	258,5	
		1:12	155,5	247,0	156,5	247,0	
		1:18	199,5	297,5	212,5	287,0	
Mehrverbrauch an Sauerstoff von Spermasol G in %			1: 6	15,8	18,1	14,5	15,9
			1:12	15,2	18,2	14,7	14,9
			1:18	17,7	19,2	15,5	15,7

Tabelle 10. Sauerstoffverbrauch von 10^9 mit Spermasol N und Spermasol G verdünnten Spermien am ersten und dritten Tag nach 60 und 120 Minuten Bebrütung bei verschiedenen Verdünnungsgraden in mm.

Beim Vergleich der Tabellen 9 und 10 zeigt sich die ejakulatspezifische Ansprechbarkeit bei allen Bullen durch ein glykokollhaltiges Verdünnungsmedium, was besonders beim Bullen D auffällt.

Wie aus der Tabelle 10 zu ersehen ist, ist der Sauerstoffverbrauch bei der Verdünnung 1:12 bei beiden Verdünnern zu jeder Zeit geringer als beim Verdünnungsgrad 1:6. Bei allen Bullen ausser P ist der Sauerstoffverbrauch von 10^9 Spermien beim Verdünnungsgrad 1:18 wider Erwarten höher als bei 1:6.

Spermasol G ist zu jedem Zeitpunkt der Messung bei allen Verdünnungsgraden dem Spermasol N um wenigstens 14,5% überlegen. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Verdünnungsgraden sind gering, wie aus Abbildung 5 deutlich zu ersehen ist.

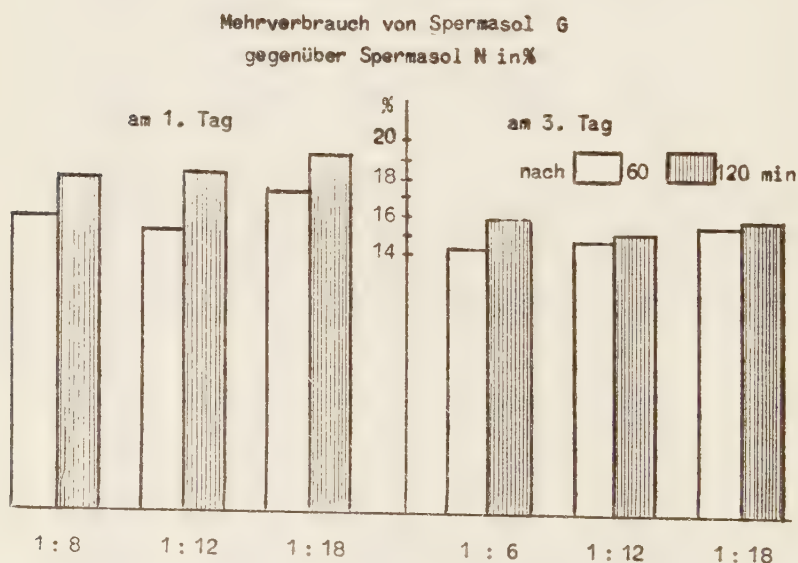


Abb. 5

Überlegenheit von Spermasol G in Prozenten bei verschiedenen Verdünnungsgraden und Messungszeitpunkten am ersten und dritten Tag.

am Verdünnungsgrad 1:12 ist sowohl am ersten wie am dritten Tag gegenüber dem Meßzeitpunkt von 60 min. nach 120 min. die Atmungskapazität gewachsen. Dasselbe gilt für den Verdünnungsgrad 1:18 am dritten Tag. Ein deutlicher Unterschied zwischen den Verdünnungsgraden kann nicht festgestellt werden.

Diskussion

Für die in vitro-Versuche standen die Versuchsbullen der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik München sowie Besamungsbullen der Besamungshauptstellen Memmingen und Aubing zur Verfügung. Das Alter dieser Bullen schwankte zwischen zwei und sechs Jahren. Die Samendichte der verwendeten Ejakulate lag zwischen 0,4 und 2,25 Mill. Samenzellen pro mm³. Ejakulate mit Anteilen von weniger als 60% vorwärtsbeweglicher Spermien wurden bei der Auswertung der Versuche nicht berücksichtigt. Es fand nur frisch gewonnenes Samenmaterial Verwendung.

Das Ziel dieser Arbeit war, einen eidotterfreien Spermaverdünner auf Trockenmilchbasis zu entwickeln und den Einfluß glykokollhaltiger Verdünnungsmedien auf den Samen zu studieren.

Dazu kann gesagt werden, daß Trockenmilchsubstanzen grundsätzlich geeignet sind, nach ihrer Resuspension mit aqua bidest, im Verhältnis 1:10 als Verdünnungsflüssigkeit für Bullensperma verwendet zu werden. Fettfreie Trockenmilchsubstanzen sind dabei fetthaltigen vorzuziehen, weil die nach der Resuspension auftretenden Fettkügelchen das mikroskopische Bild stark beeinträchtigen. Von allen geprüften Trockenmagermilchpulvern erwies sich das Molico der Firma Nestle für die weiteren Versuche als das Mittel der Wahl, weil es im Sprühverfahren hergestellt wird, somit eine optimale Löslichkeit besitzt und auf die Bewegungsaktivität und Lebensfähigkeit der damit verdünnten Ejakulate einen optimalen Effekt ausübte. Es unterliegt keinen jahreszeitlichen Qualitätsschwankungen und kann noch nach Abweichung vom Resuspensionsverhältnis 1:10 bis zu 10% als Verdünnungsmedium verwendet werden.

Der spermakonservierende Effekt beruht auf den Einzelbestandteilen der Trockenmilch, die bis auf die nicht hitzebeständigen fast dieselben sind wie bei frischer Milch, was besonders für Sprühmilchpulversorten gilt. Der von F l i p s e und Mitarb. (26) beschriebene, in frischer Milch enthaltene spermacide Faktor wird durch den Trocknungsprozeß zerstört, so daß resuspendiertes Trockenmilchpulver höchstens noch aus Gründen der Sterilisation einer Hitzebehandlung unterzogen werden braucht. Nach persönlicher Information wird in England, wo der Trockenmilchverdünner bereits auch Eingang in die Praxis gefunden hat, in letzter Zeit auf eine derartige Hitzebehandlung verzichtet. Der sonst konservierungsnegative

Verdünnungseffekt bei höheren Verdünnungen wurde mit dem Trockenmilchpuffer weitgehend unterbunden, wie auch Schmidt und Jenichen (58) bei Vollmilch feststellen konnten.

Der etwas niedrige pH-Wert der Milch von 6,4 wirkt einer raschen Glykolyse durch Verschiebung des chemischen Gleichgewichts entgegen und unterstützt damit die Stoffwechsel verlangsamende Wirkung der tiefen Aufbewahrungstemperatur. Redenz (zit. nach Götz (30)) stellte bereits fest, daß die Glykolyse durch niedere Temperaturen und niedere pH-Werte abgebrems wird.

Gelatinezusätze verbessern die Werte nicht, obwohl Gelatine niedere Eiweißbausteine enthält, die sich am Stoffwechsel der Spermatozoen beteiligen können. (Vergl. Knoop und Krauss (47)). Da jedoch zum Baustoffwechsel von den Spermien vorwiegend desaminierbare Substanzen herangezogen werden, genügen die in der Milch vorhandenen kolloid verteilten Eiweißstoffe, so daß die in der Gelatine enthaltenen Eiweißsubstanzen nicht mehr ins Gewicht fallen. Aus Gründen der Viskositätsverbesserung jedoch kann ein Gelatinezusatz bis zu einer Konzentration von 0,6% vertreten werden.

Durch einen Zusatz von 10% Eidotter kann der Trockenmilchverdünner bezüglich der Lebensdauer der Spermien um etwa 70% verbessert werden. Wegen der gestörten Homogenität des mikroskopischen Bildes konnte der genaue Prozentsatz der vorwärtsbeweglichen Spermatozoen nicht ermittelt werden. Jedoch war mit der Verlängerung der Lebensdauer auch die Bewegungsaktivität erhöht. Diese Wertverbesserung dürfte auf die im Eidotter enthaltenen Phosphorlipide, Lecithin und Cephalin zurückzuführen sein. Damit werden die Ergebnisse von Jaquet und Cassou (40) bestätigt.

Ein Glykokollzusatz in Substanz zum Trockenmilchverdünner stört in Konzentrationen von über einem Prozent die bereits bestehenden optimalen osmotischen Verhältnisse so, daß Kreis- und Rückwärtsbewegungen der Spermien auftreten. (Vergl. Tyler und Tanabe (79)). Gibt man zum Milchverdünner jedoch Glykokoll in Form einer 5,0 - 5,5%igen Lösung, so tritt eine gewaltige Verbesserung der zahlenmässigen Spermienvorwärtsbeweglichkeit und der Bewegungsintensität ein. Das optimale Verhältnis von Trockenmilchverdünner zu 5%iger Glykokoll-Lösung beträgt 3+4:1. Dieses Trockenmilch-Glykokoll-Medium erlaubt auch höhere Verdünnungen als Eidotterspermiasol, hat aber einige Nachteile. Glykokoll fördert die Sedimentation der

kolloidalen Milchbestandteile. Bei höheren Verdünnungen des Samens verstärkt sich diese Sedimentationsneigung und auch Samenzellen sind an diesem Vorgang beteiligt. Ferner tritt ein Agglutinationsphänomen auf, bei dem sich zwei bis vier Spermienköpfe zusammenlegen, ohne ihre Beweglichkeit zu verlieren. Diese Nachteile können durch einen Zusatz von 0,3 - 0,6% elektrolytfreier, wärmedepolymerisierter Gelatine weitgehend behoben werden.

Ein Trockenmilch-Glykokoll-Verdüner, bestehend aus 7,78 g Trockenmagermilch, 1,16 g Glykokoll und 0,5 g Gelatine, ist in Bewegungsaktivität und Lebensdauer dem Eidotterspermasol, speziell bei höheren Verdünnungsgraden und dem reinen Trockenmilchverdünner besonders bei längeren Aufbewahrungszeiten überlegen.

Trotz seines niedrigen pH-Wertes von 5,0 (bei 22° C) zeigt das Glykokoll einen günstigen Einfluß auf die Motilität und Lebensfähigkeit der Spermien bei bestimmten Konzentrationen. Der Grund hierfür darf wohl in einer aktiven Beteiligung am Energiestoffwechsel der Spermatozoen zu suchen sein, einerseits durch die oxydierbaren bzw. desaminierbaren Radikale des Glykokoll-Moleküls, andererseits evtl. durch eine katalisatorische, in diesem Falle stoffwechselbeschleunigende Wirkung.

Im Gegensatz zu den Tabellen 1 und 2 zeigt die Tabelle 3 nach 24 Stunden zum Teil eine geringe Wertverbesserung gegenüber dem Vortage. Diese Abweichung von den ersten beiden Tabellen dürfte auf unterschiedliche Aufbewahrungsbedingungen zurückzuführen sein. Während bei den Versuchen 25-27 und 31-33 die Samenproben mit paraffinierten Korken verschlossen waren, sich also meist eine mindestens 1 cm hohe Luftsäule über dem Samengemenge befand, wurden die Samenproben der Versuche 34-44 mit Paraffinum liquidum überschichtet.

Bei der Tabelle 3 schwankten die Werte zwischen den einzelnen Verdünnungsgraden anfänglich sehr gering. Daher wurde jeweils eine Kommastelle mitberechnet.

Ein teilweiser Ersatz des Natriumcitrats im Spermasol führt ebenfalls zu Erhöhung von Bewegungsaktivität und Lebensdauer, ganz besonders bei steigendem Verdünnungsgrad. Dabei wirkt sich die zunehmende Neigung der Kopfagglutination nachteilig aus. Bei einem engeren Verdünner-Eidotter-Verhältnis als 5:1 kommt es mehr oder weniger rasch zur Sedimentation von Eidotterkolloiden, die am Boden des Aufbewahrungsgefäßes einen rahmigen

im bilden und sich im mikroskopischen Bild auf die Homogenität des Verdünners störend auswirken. Zu 100 ml Verdünnung dürfen also höchstens 20 ml Eidotter zugesetzt werden.

Aus den Versuchen 46-52 entwickelte Spermasol G ist, wie aus den Tabellen 4 und 5 zu ersehen ist, in der Praxis mindestens ein bis zwei Tage länger verwendungsfähig als das bisher verwendete Spermasol N.

Vergleicht man in Tabelle 5 die beiden glykokollhaltigen Verdünnungsmedien, so ergibt sich doch ein grosser Unterschied. Spermasol G hat eine höhere Anfangsbeweglichkeit bei allen Verdünnungsgraden. Molico-Glykokoll mit Gelatinezusatz weist nach anfänglich etwas niedrigerer Vorwärtsbeweglichkeit und einem höheren Anteil an toten Spermien weitaus geringere Unterschiede zwischen den einzelnen Verdünnungsgraden auf. Weiterhin ist speziell bei hohen Verdünnungen der Anteil der Kopfagglutination zahlenmässig geringer als bei Spermasol G. Die anfänglich quantitativ kleinere Motilität dürfte auf einen Verdünnungsschock zurückzuführen sein, bei dem alle lebensschwachen Spermatozoen sofort abgetötet werden. Auf diesem Wege läßt sich der stets recht geringe Anteil an ortsbeweglichen Samenzellen erklären. Bei Spermasol G wird ein derartiger Verdünnungsschock wahrscheinlich durch den Eidottergehalt abgefangen. Trotzdem kann beim Molico-Glykokoll-Gelatine-Puffer auf einen Eidotterzusatz verzichtet werden. Damit wäre das gestellte Ziel dieser Arbeit, einen eidotterfreien, praxisfähigen Spermaverdünner zu entwickeln, erfüllt.

Zur Erhärtung der mikroskopischen Untersuchungsergebnisse wurde im Teil B dieser Arbeit zur vergleichenden Untersuchung über den Einfluß glykokollhaltiger Verdünnungsmedien auf die Spermien die Manometrische Methode zur Messung des Sauerstoffverbrauchs nach Warburg angewandt.

Diese Meßmethode ist hinreichend objektiv, um über den Umfang der vom Sauerstoffverbrauch abhängigen, also aeroben oder oxydativen Stoffwechselvorgänge ein klares Bild zu entwerfen. Ob jedoch die Höhe des Sauerstoffverbrauchs als Maß für die Befruchtungsfähigkeit angesehen werden kann, ist allerdings noch nicht genügend belegt. G o s h und Mitarb. (29) konnten jedenfalls keinen Zusammenhang zwischen der metabolischen Aktivität und dem Befruchtungssatz feststellen. Wie die Erfahrung lehrt, stimmt auch der Grad der prozentuellen Spermienvorwärtsbewegung nicht immer mit den tatsächlichen Befruchtungsergebnissen überein.

Um die von den Spermien verschiedener Ejakulate verbrauchten Sauerstoff-

mengen wegen der verschiedenen Dichten und der zum Teil aus versuchsbedingten Gründen verschiedener Verdünnungsgrade vergleichen zu können, wurden sämtliche errechneten Werte auf den Sauerstoffverbrauch von 10^9 Spermien bezogen.

Die Ergebnisse der Versuche 73-83 lassen bereits erkennen, daß trotz des stärkeren Abfalls der Atmungsintensität bei Spermasol G der Sauerstoffverbrauch von 10^9 Spermien zu jedem Meßzeitpunkt noch höher war als bei Spermasol N. Die einzelnen Ejakulate sind durch den glykokollhaltigen Verdünnner in verschiedenem Masse ansprechbar. Ein Vergleich zwischen Verdünnungsgraden von 1:6, 1:12 und 1:18 ergibt eine höhere Stoffwechselintensität bei Spermasol G am ersten Tag von 18,1 - 19,2%, am 3. Tag von 14,9 - 15,9% nach 120 Minuten Bebrütungszeit. Die Unterschiede in den einzelnen Verdünnungsgraden sind nicht signifikant genug, um behaupten zu können, daß bei zunehmendem Verdünnungsgrad auch die Überlegenheit von Spermasol G grösser wird, wie man doch auf Grund der mikroskopischen Untersuchungsergebnisse annehmen möchte.

Der absolute Sauerstoffverbrauch von Spermasol N - und Spermasol G-Samen war beim Verdünnungsgrad 1:18 jeweils wider Erwarten höher als bei Verdünnungen von 1:6 bzw. 1:12. Der Grund für diese Erscheinung dürfte darin zu suchen sein, daß zwischen den Verdünnungsgraden 1:12 und 1:18 eine kritische Zone liegt, nach deren Überschreitung die ansteigende Pufferkapazität den Einfluß des konservierungsnegativen Verdünnungseffektes überwiegt. Eine Zunahme der Pufferkapazität mit steigendem Verdünnungsgrad ist so erklärbar, daß 1. bei einem stark verdünnten Ejakulat die einzelnen Samenzellen von mehr Pufferflüssigkeit umspült werden als bei einem weniger stark verdünnten und dadurch die Abpufferung der beim Stoffwechsel der Spermien gebildeten organischen Säuren rascher und kontinuierlicher erfolgt, 2. bei höheren Verdünnungen ohnehin weniger Spermien vorhanden sind und somit die Keto-Säurebildung geringer ist.

Zusammenfassend kann nun gesagt werden, daß jedes Ejakulat auf die Verdünnung mit dem glykokollhaltigen Spermasol stets mit einer Erhöhung der Atmungskapazität, besonders in den ersten 45 min. reagiert. Diese Ergebnisse basieren auf Versuchsbedingungen, die den Temperaturverhältnissen im weiblichen Genitaltrakt gleichen. Die Messung des Sauerstoffverbrauchs während der Aufbewahrungstemperatur von $+5^{\circ}\text{C}$ war aus versuchstechnischen Gründen nicht durchführbar.

Die Ergebnisse der Versuche 49-83 haben also bewiesen, daß das Spermasol G durch Steigerung und Verlängerung von Bewegungsaktivität und Atmungskapazität einen konservierungspositiven Effekt auf die Samenzellen ausübt. Es kann durchaus möglich sein, daß bei Verwendung von Spermasol-G-Samen eine grössere Befruchtungswahrscheinlichkeit gegeben ist.

Der Wirkungsmechanismus von Glykokoll hat bisher folgende Erklärungen gefunden:

- 1) Tyler und Atkinson (78) vermuteten, daß Glykokoll einen metabolischen Effekt auf die Samenzellen ausübt, der vor allem von der Aminogruppe ausgehen soll. Das danach als Stoffwechselprodukt auftretende Ammoniak konnte nicht sicher nachgewiesen werden.
- 2) Flips und Almquist (25) konnten durch Messung des Fruktoseverbrauchs und der Milchsäurebildung keinen ausgesprochenen Effekt des Glykokolls auf die Glykolyse feststellen. Nach Verwendung von Glykokoll mit C^{14} wurden C^{14} -Atome in den Spermienköpfen gefunden. Demnach wird Glykokoll beim Stoffwechselvorgang abgebaut.
- 3) Roemmele (59) fand, daß Essigsäure selbst in Spuren die Samenfäden sofort abtötete. (Diese Feststellung erscheint für spätere Gedankengänge erforderlich.)

Durch einen optimalen Glykokollzusatz zu einem Verdünnungsmedium wird erreicht:

- 1) Höhere Bewegungsaktivität über längere Zeit und somit längere Lebensdauer,
- 2) grössere Atmungsintensität, besonders während der ersten 30-45 min. der Bebrütung.

Es interessieren nun die Fragen: Wie greift das Glykokoll in den Stoffwechsel ein? Welche chemischen Reaktionen laufen dabei ab?

Allgemein ist bekannt, daß die Umwandlung der Nahrung in chemische Energie in drei Phasen abläuft.

Phase I: Zerlegung von Makromolekülen. Dabei werden die Nahrungsstoffe für die eigentliche Energielieferung durch Reduktion auf 20 Aminosäuren, drei verschiedene Zuckerarten und Fette vorbereitet.

Phase II: Diese Substanzen werden nun auf dem Wege der unvollständigen Verbrennung auf nur drei Endprodukte gebracht: Essigsäure, α -Ketoglutar-

säure und Oxalessigsäure. Diese Reaktionskette wird unter dem Namen anaerobe oder anoxydative Verbrennungsphase zusammengefaßt, weil hierbei kein Sauerstoff verbraucht wird.

Phase III: Der letzte Abbauweg verläuft nach einem gemeinsamen Prinzip über den Trikarbonsäure-Zyklus oder Zitronensäure-Zyklus. Diese aerobe oder oxydative Phase vollzieht sich unter der Aufnahme von Sauerstoff, der letzten Endes nur als Wasserstoffakzeptor dient. Dabei werden die drei Grundsubstanzen phosphoryliert und vorwiegend zu einer Zwischensubstanz aufgebaut, dem "ATP" (Adenosintriphosphat), dem eigentlichen Energiespender einer jeden Zelle. Von diesem Energiespender aus wird die Energie in sechs verschiedenen Typen von energieliefernden Reaktionen an das Erfolgsorgan gesendet. Drei davon sind heute genau bekannt.

Für unsere Betrachtung spielen nur die Phasen II und III eine Rolle, da das Glykokoll in diesem Falle bereits als solches zum Verdünnungsmedium gegeben wurde und nicht erst aus einem grossen Molekülverband herausgelöst zu werden braucht.

Glykokoll (= Glycin) ist die einfachste Aminosäure; es ist für Säugetiere nicht essentiell und kommt z.B. in der Milch nicht vor. Es kann sowohl mit Basen wie mit Säuren eine Verbindung eingehen und ist somit ein Ampholyt.

Es ist mit hoher Wahrscheinlichkeit anzunehmen, daß

- 1) Glykokoll auf osmotischem Wege in die Samenzellen gelangt,
- 2) intrazellulär durch Desaminierung die Aminogruppe abgibt (Phase II) und
- 3) die entstehende Essigsäure sofort phosphoryliert wird (Phase III), um in den Trikarbonsäure-Zyklus eingreifen zu können.

Meiner Meinung nach können für den ausserordentlich günstigen Effekt des Glykokolls diese drei Tatsachen verantwortlich gemacht werden.

Zu 1: Die Geschwindigkeit der Diffusion ist u.a. auch proportional der Konzentration, der Temperatur und umgekehrt proportional der Viskosität und dem Molekulargewicht, Daraus geht hervor, daß die Diffusion des Glykokolls in die Samenzelle bei der niederen Aufbewahrungstemperatur des Spermas bei +5° C und der dadurch bedingten höheren Viskosität (Gelatine!) weitgehend abgebremst wird. Damit wird also die Forderung erfüllt, das Energiepotential der Spermatozoen während der Lagerung möglichst zu scho-

nen. Wird jedoch das Samen-Puffer-Gemisch auf 38°C gebracht, wie es bei unseren Untersuchungs- und Testmethoden sowie bei den Inseminationen in praxi der Fall ist, so werden die Diffusionsvorgänge wieder beschleunigt. Dabei kommt vor allen anderen organischen Substanzen dem Glykokoll sein verhältnismässig niedriges Molekulargewicht zugute, was sich wiederum auf die Geschwindigkeit der Diffusion beschleunigend auswirkt.

Zu 2: Vor allen anderen energieliefernden Stoffen hat nun wiederum das Glykokoll den Vorzug bei kürzester Reaktionsgeschwindigkeit die Phase II zu durchheilen, weil nur die Aminogruppe abgespalten zu werden braucht, damit eines der drei für die Phase II charakteristischen Endprodukte, nämlich Essigsäure, entstehen kann. Da dieser Desaminierungsvorgang in die anaerobe Phase fällt, war es mittels des Warburg-Tests nicht möglich, einen aus ihm resultierenden metabolischen Effekt auf die Samenzellen, wie ihn T y l e r und A t k i n s o n (78) annahmen, nachzuweisen.

Zu 3: Nach der Desaminierung wird die entstehende Essigsäure sofort phosphoryliert. Die Tatsache, daß Essigsäure bereits in Spuren die Samenfäden abtötet, wie R o e m m e l e (59) feststellte, dürfte auf einer Schockwirkung beruhen, bei der durch die freie Essigsäure ein Übermaß an Adenosinphosphorsäure gebunden wird, so daß die chemischen Gleichgewichtsverhältnisse irreversibel gestört werden.

Die phosphorylierte Essigsäure tritt in den Trikarbonsäure-Zyklus ein und wird unter Energieabgabe stufenweise oxydativ abgebaut. Dieser oxydative Abbau war bei Ejakulaten, die mit Spermasol G verdünnt wurden, durch den Warburg-Test meßbar. Ob der erhöhte Sauerstoffverbrauch bereits durch die bei 1) beschriebenen chemisch-physikalischen Reaktionen bedingt ist oder durch einen von der Aminogruppe des Glykokolls ausgehenden Effekt, kann mit den zur Verfügung stehenden Versuchsergebnissen nicht geklärt werden.

Aus dem über die Diffusionsvorgänge Gesagten sind zum Teil auch die Ergebnisse der Versuche 20-24 und 73 zu erklären. Dabei ergab sich:

- 1) Längste Lebensdauer bei Verwendung einer 5,0%igen Glykokoll-Lösung, optimale Bewegungsaktivität bei einer 5,5%igen Glykokoll-Lösung.
- 2) Längste Lebensdauer wird erreicht bei 50%igem Glykokollanteil am Verdünnner, höchste und längste Bewegungsaktivität und Atmungsintensität bei 25%igem Glykokollanteil.

Zu 1: Da die Diffusionsgeschwindigkeit auch der Konzentration einer Lösung proportional ist, wird bei einer 5,5%igen Glykokoll-Lösung das chemische Gleichgewicht so beeinflusst, daß infolge der grösseren Diffusionsmöglichkeit auch tatsächlich, selbst bei der niedrigen Aufbewahrungstemperatur, der Stoffwechsel gesteigert ist. Die Folge davon ist höhere Bewegungsaktivität und wegen vorzeitiger Erschöpfung der Pufferkapazität kürzere Lebensdauer.

Zu 2: K a m p s c h m i d t und Mitarb. (46) ersetzten das Natriumcitrat bei einem Eidottercitratverdünner in steigendem Masse durch Glukose und stellten fest, daß bei Überschreitung des optimalen Glukose-Citrat-Verhältnisses der pH-Wert unter das bewegungserhaltende Minimum abfiel. Das trifft analog für unseren Fall zu. Da beim Glykokoll-Milchverdünner die Milch als Puffersubstanz wirkt, wird beim 50%igen Glykokollanteil die Pufferkapazität der Milch überfordert. Dann tritt wegen Anhäufung von NH_3 eine Autointoxikation ein (vergl. H o r o v a t h und S o l y m o s s (36)).

Zusammenfassung

- 1) Nach Besprechung der einschlägigen Literatur wird die Möglichkeit der Schaffung eines eidotterfreien Verdünnners auf Trockenmilchbasis und der Einfluß von glykokollhaltigen Verdünnungsmedien auf den Samen überprüft. Dabei kam zur Beurteilung des verdünnten Samens die allgemein gebräuchliche mikroskopische Untersuchungsmethode sowie die manometrische Methode zur Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs nach Warburg zur Anwendung.
- 2) Von allen geprüften Trockenmilchsubstanzen wurde das im Sprühverfahren hergestellte Magermilchpulver "Molico" wegen seiner optimalen Resuspendierbarkeit herausgegriffen. Auf eine Hitzebehandlung nach der Resuspension im Verhältnis 1:10 kann verzichtet werden. Gelatinezusätze verbessern nur die Viskositätsverhältnisse. Durch einen Zusatz von 10% Eidotter kann die Bewegungsaktivität jedoch verbessert und die Lebensdauer verlängert werden. Dabei werden die Werte von Eidotterspermasol übertroffen.
- 3) Aus dem Trockenmilchverdünner wurde durch Zusatz von Glykokoll in geeigneten Konzentrationen und wärmedepolymerisierter Gelatine ein Samenverdünner entwickelt, der das als Kontrollverdünner dienende Spermasol N (Mack) besonders bei höheren Verdünnungsgraden in der Erhaltung von Bewegungsaktivität und Lebensdauer der Samenzellen übertrifft.
- 4) Durch einen teilweisen Ersatz des Natriumcitrates beim Spermasol N durch Glykokoll konnten ebenfalls Wertverbesserungen erzielt werden. Dieser modifizierte Spermasol N-Verdünner setzt sich somit aus 1,86% Spermasolgrundsubstanz, 1,5% Glykokoll und 0,8% wärmedepolymerisierter Gelatine zusammen.

Literaturverzeichnis

- 1) Aehnelt, E.: Vergleichende experimentelle Prüfung der Spermaverdünner Eidotterspermasol Fortpfl.u.Besamung der Haustiere. 5: 34, 1951
- 2) Aehnelt, E.: Prüfungsergebnisse neuer Verdünnungsflüssigkeiten für das Bullensperma. Fortpfl.u.Besamung der Haustiere. 7: 52, 1953
- 3) Almquist, J.O.: Diluters for Bovine Semen. V. A comparison of heated skim milk and egg yolk-citrate as diluters for semen from bulls of high and low fertility. Journ.Dairy Sc. 37: 1308, 1954
- 4) Almquist, J.O., R.J.Flipse and D.L. Thaker: Diluters for Bovine Semen. IV. Fertility of bovine spermatozoa in heated homogenized milk and skim milk. Journ.Dairy Sc. 37: 1303, 1954
- 5) Almquist, J.O. and D.L. Thaker: Fertility of bull semen with boiled, homogenized milk and boiled skim milk. Journ.Animal Sc. 11: 787, 1952
- 6) Asher, Th. und K. Kaemmerer: Versuche zur Spermaphysiologie Zschr.f.Tierz.u.Züchtungsbiologie 58: 351, 1950
- 7) Aslanjan, M.M.: Die Wirksamkeit der Mucinase als Zusatz zum Samenverdünner. Sovjetskaja Zootechnika 8: 86, 1953 Ref.: Fortpfl.u.Besamung der Haustiere 12: 155, 1954
- 8) Austin, C.: Function of hyaluronidase on fertilisation. Nature 162: 63, 1948
- 9) Bayley, N.D., H.N. Cobbs and G.R. Barrett: A synthetic pabulum vs. yolk-citrate buffer as a diluter of bull semen. Journ.Dairy Sc. 33: 24, 1950
- 10) Bergmeyer, H.U.: Reaktionskinetische Untersuchungen zur Messung der Glykolyse. Biochem.Zschr. 323: 163, 1952
- 11) Boguth, W.: Über den Plasmalogengehalt im Sperma. Naturwissenschaft 432, 1952

- 12) Boguth, W.:
Spermaverdünnung und Trockensubstanz zu seiner Herstellung.
Patentschrift. PA 515125-6.10.1951
- 13) Bratanoff, K.:
Osservazioni su alcune proprietà di taluni mestruai per la diluizione della sperma bovina.
Fecond.artif. 5: 17, 1943
Biologische Brauchbarkeit verschiedener Verdünnungsmedien für Bullensamen.
Ref.: BMTW 19, 1948
- 14) Brennecke, E.:
Versuche zur Verdünnung des Bullenspermas
Med.vet.Diss.Hannover, 1951
- 15) Calisti, V.:
Verteilung und Unterschiede der Hyaluronidase in der Samenflüssigkeit des Stieres.
Zooten.e.Vet. 4: 867, 1949
Ref.: Vet.medizin 117, 1950
- 16) Collins, W.J.:
Evaporated milk as a diluter for bovine semen.
Journ.Dairy Sc. 36: 578, 1953
- 17) Dixon:
"Manometric Methods"
3rd Ed.Cambridge Univ.Press 1951
- 18) Dreher, W.H. and J.H. Webb:
A comparison of homogenized whole milk and egg yolk-phosphate as diluters for bull semen.
Journ.Dairy Sc. 36: 673, 1953
- 19) Dunn, H.O. and R.W. Bratton:
Buffered whole egg as a nutrient extender for bovine spermatozoa
Journ.Dairy Sc. 32: 722, 1949
- 20) Dunn, H.O. and R.W. Bratton:
Motility of bovine spermatozoa in buffered whole egg.
Journ.Dairy Sc. 33: 430, 1950
- 21) Dunn, H.O., R.W. Bratton and W.J. Collins:
Fertility and motility of bovine spermatozoa in buffered whole egg extenders.
Journ.Dairy Sc. 33: 434, 1950
- 22) Fiorentino, A.:
L'emploi du lait écrémé dans la dilution du sperme de taureau.
Reprod.and Artif.Insemination. Kopenhagen 1952, Addendum S. 12 Ref.: Fortpfl.u.Besamung d.Haustiere 10: 87, 1953

- 23) Fiorentino, A. und
A. Caretta:
Ergebnisse eines Zusatzes kristallisierter Hyaluronidase zum Sperma vom Bos taurus
Zootech.e.Vet. 6: 449, 1951
Ref.: Vet.medizin 6: 529, 1953
- 24) Flerchinger, F.H.,
R.E. Erb and
M.H. Ehlers:
The use of homogenized milk as a diluter for bull semen.
Journ.Dairy Sc. 36: 1016, 1953
- 25) Flipse, R.J. and
J.O. Almquist:
Effect of milk-glycine and egg yolk-glycine diluents on the survival of bovine spermatozoa.
Journ.Animal Sc. (Soc. Proceed.) 14: 1183, 1955
- 26) Flipse, R.J.,
St. Patton and J.O.Almquist:
Diluters of Bovine Semen. III. Effect of lactenin and of lactoperoxydase upon spermatozoan livability.
Journ.Dairy Sc. 37: 1205, 1954
- 27) Fritsch, W.:
Untersuchungen über die Wirkung von Hyaluronidasezusätzen auf das Bullensperma im Reagenzglas.
Med.vet.Diss.Hannover, 1952
- 28) Giese, A.C. and
P.A. Wells:
Protective Effect of Glycine on Sperm Exposed to light.
Science: 115: 239, 1952
- 29) Gosh, D.,
L.E. Casida and H.A.Lardy:
A study of the metabolic activity of bull semen and spermatozoa in relation to their fertilizing ability.
Journ.Animal Sc.: 8: 265, 1949
- 30) Götze, R.:
Besamung und Unfruchtbarkeit
M.u.H. Schaper, Hannover 1949
- 31) Hanneck, E.:
Versuche zur Verdünnung des Bullenspermas mit den Salzen der Acrylsäure.
Med.vet.Diss. Hannover 1952
- 32) Herrick, J.B.:
Die Wirkung der Homogenisierung, Pasteurisierung und Trocknung von Eidotter-Natriumcitratlösungen für Bullensamen.
Amer.Journ.vet.Res. 11: 159, 1950

- 33) Hoffmann, K.: Die künstliche Befruchtung der Stuten.
Zschr.f.Gestütskunde 11, 1907
- 34) Hoelzer, H.: Erfahrungen mit dem Verdünnerspermasol
Fortpfl.u.Besamung der Haustiere
5: 36, 1951
- 35) Hoelzer, H. und H. Hanske: Der Eidotterverdünner und seine Filtration
Fortpfl.u.Besamung der Haustiere
11: 86, 1952
- 36) Horovath, J. und B. Solymoss: Über einige biochemische Kennzeichen des
Bullenspermas
Acta vet.hung.401, 1953
Ref.: Mhefte f.Vet.medizin
9: 462, 1954
- 37) Hurst, V. und J.P.LaMaster: The use of frozen skim milk as a semen
diluter
49th Ann.Meet.A.Dairy Science Assoc.
Pennsylvania State Univ.June 1954
- 38) Idelberger, S.: Das Verhalten des Rinderspermas in
Fruchtwässern und Preßsaft von Rinder-
embryonen.
Med.vet.Diss.Hannover, 1952
- 39) Jacquet, J. et R. Cassou: Nouvelles recherches sur un milieu à
base de lait écrémé en vue de la dilution
et de la conservation du sperme de
taureaux.
Bull.Acad.Vét. 25: 153, 1952
- 40) Jacquet, J. et R. Cassou: Influence de la dilution du sperme dans
un nouveau milieu a base de lait écrémé
sur la fécondité des taureaux
Académie d'Agriculture de France.
(Extr.du procès-verbal de la Séance du
21.Mai 1952)
- 41) Johnson, P.E., R.J. Flipse und J.O. Almquist: Diluters of Bovine Semen. IV. The effect
of cysteine hydrochloride on the livabili-
ty of bull spermatozoa in unheated skim
milk.
Journ.Dairy Sc. 38: 53, 1955

- 42) Jürgens, F.:
Ascorbinsäuregehalt von Sperma fruchtbarer und unfruchtbarer Bullen und Ziegenböcke.
Med.vet.Diss. Hannover, 1942
- 43) Kaemmerer, K. und
H.G. Neumann:
Über reduzierende Substanzen im Cervikalschleim des Rindes.
Zschr.f.Zücht.biol. 58: 416, 1950
- 44) Kampschmidt, R.F.,
D.T. Mayer, H.A. Herman
and G.E. Dickerson:
Sedimentation of spermatozoa and settling of diluter solids and their effects upon survival of spermatozoa
Journ.Dairy Sc. 34: 21, 1951
- 45) Kampschmidt, R.F.,
D.T.Mayer, H.A.Herman
and G.E. Dickerson:
Viability of bull spermatozoa as influenced by elektrolyt concentration, buffer efficiency and added glucose in storage media.
Journ.Dairy Sc. 34: 45, 1951
- 46) Kampschmidt, R.F.,
D.T.Mayer and H.A.Herman:
Lipoid and lipoprotein constituents of egg yolk in the resistance and storage of bull spermatozoa
Journ.Dairy Sc. 36: 733, 1953
- 47) Knoop, C.E. and
W.E. Krauss:
Storage of bovine spermatozoa in diluents containing certain amino acids.
Report.P 44 in Journ.Dairy Science, 27: 657, 1944
- 48) Kordts, E. und
S. Scholtyssek:
Untersuchungen über die Eignung verschiedener Spermaverdünner.
Kieler Milchwirtsch.Forsch.ber. 4: 701, 1952
- 49) Kriisa, A.:
Besamungsversuche mit durch inaktiviertes Pferdeserum verdünntem Rindersperma
DTW 54: 282, 1947
- 50) Lorenz, F.W. und
A. Tyler:
Die Verlängerung der Lebensdauer der Spermatozoen vom Haushahn durch Aminosäuren und Proteine
Ref. Berichte über d.ges. Biologie Abtl. B, 155: 365, 1953
- 51) Marion, G.B. and
H.H. Olson:
Reconstituted skim milk as a diluent for bovine semen
Journ.Dairy Sc. 35: 491, 1952

- 52) Mihailov, N.N.: Moločnye razbaviteli spermy životnyh. Konevodstvo 6: 14, 1949
Milk as a diluent for the semen of animals
Ref.: Anim.Breed.Abstr.24, 1950
- 53) Peters, J.: Vergleichende Untersuchungen über die Brauchbarkeit des Eidottermilchverdünners. Fortpfl.u.Besamung der Haustiere 2: 14 und 3: 17, 1953
- 54) Philipps, Ph.: Preservation of bull semen
Journ.Biol.Chem. 130: 415, 1939
- 55) Philipps, Rh. and H. Lardy: A yolk buffer pabulum for preservation of bull semen
Journ.Dairy Sc. 23: 399, 1940
- 56) Philipps, Ph. and H. Lardy: Phosphor lipoids as a source of energy for motility of bull spermatozoa
Amer.Journ.Physiol. 138: 195, 1941
- 57) Philipps, Ph. and R.R. Spitzer: A synthetic pabulum for the preservation of bull semen
Journ.Dairy Sc. 29: 407, 1946
- 58) Fursley, G.R., H.A. Herman, M. Dickensheet and R. Waters: A comparison of various semen diluters in maintaining motility of bovine spermatozoa
Journ.Dairy Sc. 33: 216, 1950
- 59) Roemmele, O.: Biologische und physiologische Untersuchungen am Sperma und Scheidensekret des Rindes im Hinblick auf die künstliche Besamung.
Med.vet.Diss. München, 1926
- 60) Rottenstein, K. und H. Wibling: Sammenligning mellem flydende og gelatineret fortyndingsvaedske
Beretn. Forsøgslab. 253: 15, 1951
- 61) Roy, A. and M.W.H. Bishop: Effect of glycine on the survival of bull spermatozoa
Nature, (Lond.) 174: 746, 1954
- 62) Rödel, L. und H. Karg: Beitrag zum Mechanismus des Befruchtungsvorganges bei Säugetiereh
Fortpfl.u.Besamung der Haustiere 5: 35, 1955

- 63) Rullfes, R.: Versuche zur Verdünnung von Bullensperma
Med.vet.Diss. Hannover, 1951
- 64) Salisbury, G.W., H.K. Fuller and E.L. Willet: Preservation of bovine spermatozoa in
yolk-citrate diluent and field results
from its use.
Journ.Dairy Sc. 24: 905, 1941
- 65) Salisbury, G.W., J.A. Zelaya and N.L. VanDemark: Livability and glykolysis of bovine
spermatozoa in yolk-citrate, incubated
eggs or chick embryo diluters
Journ.Animal Sc. 4: 270, 1945
- 66) Sarkar, B.C. R.W. Luecke and C.W. Duncan: The amino acid composition of bovine
semen
Journ.Biol.Chem. 171: 463, 1947
- 67) Schersten, E.: Studien über das Vorkommen und die
biologische Bedeutung des Zitrats in
den Geschlechtssekreten der Menschen und
der Tiere.
Scand.Arch.Physiol.Supplem.
7: 1, 1936
- 68) Schmidt, K. und W. Jenichen: Versuche zur Verdünnung von Bullensperma.
III.Mitteilung: Einfluß des Verdünnungs-
verhältnisses
Mhefte f. Vet.Medizin 9: 5, 1954
- 69) Schwarz, G.: Phosphat- und Zitratverdünnungsmittel für
Rindersperma mit und ohne Eidotter
Med.vet.Diss. Hannover, 1949
- 70) Sobek, V.: Mléko jako ředidlo býčoho semene v
inseminaci
Sborn.čsl.Akad.země.Vet.A.
26: 475, 1953
Milk as a diluent for bull semen for
artificial insemination
Ref.: Anim.Breed.Abstr.22: 46, 1954
- 71) Sokolowskaja, I.I.: Untersuchungen der Rolle einiger Amino-
polysaccharide und der auf sie wirkenden
Fermente der Säugetiere.
Z.obšč.Biol. 14: 96, 1953
Ref.: Berichte über d.ges.Biologie
Abt. A 89: 91, 1953

- 72) Sokolowskaja, I.I.: Wirkung eines synthetischen Verdünnners mit Mucinasezusatz auf den Besamungserfolg und die Lebenskraft der Kälber.
Shiwodnowodstwo 5: 102, 1953
Ref.: Fortpfl.u.Besamung der Haustiere 3: 23, 1955
- 73) Sørensen, E.: Insemination with gelatinised sperm in paraffined cellophane tubes.
Vet. Journ. 102: 235, 1946
- 74) Thaker, D.L. and J.O. Almquist: Milk and milkprodukte as diluters for bovine Semen.
Journ.Animal Sc. 10: 1082, 1951
- 75) Thaker, D.L., R.J. Flipse and J.O. Almquist: Diluters for Bovine Semen: II. Effect of milk proteins upon spermatozoan livability
Journ.Dairy Sc. 37: 220, 1954
- 76) Totic, J.A.: Mechanism of hydrogen peroxyde by spermatozoa and the role of amino acids in sperm motility
Nature: 544, 1947
- 77) Totic, J.A. and A. Walton: Metabolism of spermatozoa. The formation and elimination of hydrogenperoxyde by spermatozoa and effects on motility and survival
Ref.: Berichte über d.ges.Biologie Abt. B 147: 349, 1952
- 78) Tyler, A. and E. Atkinson: Influence of glycine on sea-urchin spermatozoa
Science 112: 783, 1950
- 79) Tyler, A. and T.Y. Tanabe: Motile life of bovine spermatozoa in glycine and egg yolk-citrate diluents at high and low temperatures
Proc.Soc.exp.Biol. 81: 367, 1952
- 80) Umbreit, Burris and Stauffer: Manometric Techniques and Related Methods for the study of Tissue Metabolism
Minneapolis. Burges Publ.Co. 1945

- 81) Veiga, J.S., A.Chieffi,
N.Masotti and J.A.Ribeiro: diluição do semen de bovino em leite
desnatado p6. (Engl. summary)
Zootecnia (Madrid) 3: 147, 1953
- 82) Voit, K. und H.Seckfort: Vorkommen und Stoffwechsel des
Plasmalogens.
Med.Klinik: 485, 1953
- 83) Warburg, O.: Stoffwechsel der Tumore
Berlin, 1926
- 84) Weiss, K.: Ein neues Verdünnungsmittel für
Bullensperma
WTM: 668, 1952, sowie
Kiel.Milchw.Forsch. ber. Heft 4, 1951
- 85) Winter, G.: Ein Beitrag zur Verdünnung des Rinder-
spermas unter Verwendung von Cebion.
Med.vet. Diss. Hannover, 1949
- 86) Wolfertz, J.: Untersuchungen über die Wirkung verschie-
dener Pflanzenkolloide auf das Bullensper-
ma in vitro im Vergleich zum Eidotter-
spermasol und Eidotterzitraterdünner.
Med.vet. Diss. Hannover, 1953
- 87) Wolff, G.: Beiträge zur Physiologie von Samenzellen
und Samensekreten von Bullen
Med.vet. Diss. München 1955
- 88) Wolz, G.: Beitrag zur Biochemie von Ejakulat,
Samenblasensekret und Vaginalschleim von
Rindern.
Med.vet.Diss. München 1953.

Dem Vorstand der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik, Herrn Professor Dr. W. B a i e r, möchte ich am Schluß meiner Arbeit für die Überlassung des Themas ergebenst danken.

Herrn Konservator Dr. W. L e i d l gilt mein besonderer Dank für die freundliche Unterstützung, die er mir zuteil werden ließ.

Ebenso danke ich dem Leiter der Besamungshauptstelle Memmingen, Herrn Dr. M. S c h r ö d l, für das zur Verfügung gestellte Versuchsmaterial, sowie den Firmen N e s t l e und H. M a c k Nachf., für die kostenlose Überlassung der Präparate.

Lebenslauf

Am 27. September 1933 wurde ich, Walter Karl G r e i f f, als Sohn des Landwirts und Kaufmanns Karl Greiff und seiner Ehefrau Charlotte, geb. Kurtz, in Memmingen geboren. Nach vierjährigem Besuch der dortigen Volksschule trat ich im September 1944 in die Staatl. Oberschule für Knaben in Memmingen über. Im Juli 1952 legte ich dort die Reifeprüfung ab und immatrikulierte mich im folgenden Wintersemester an der Universität München, wo ich nach dem Sommersemester 1954 die Physikumsprüfung ablegte.

